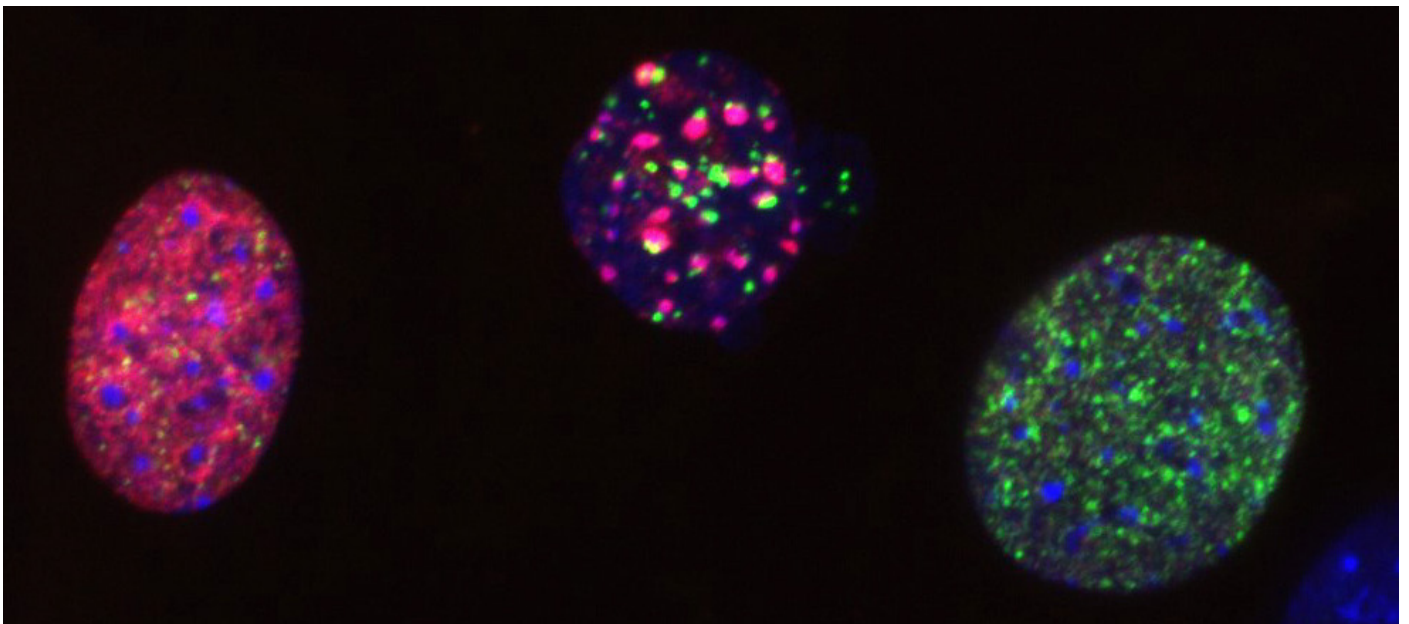


**Tesis Doctoral**



Instituto de Biología Funcional y Genómica  
CSIC-Universidad de Salamanca

# **Regulación de la dinámica de replicación del DNA por APC/C-Cdh1 y sus consecuencias sobre la estabilidad del genoma**



Javier Garzón Hidalgo

Salamanca, 2015

El **Dr. D. Sergio Moreno Pérez**, Profesor de Investigación del Consejo Superior de Investigaciones Científicas,

y la **Dra. D<sup>a</sup>. Irene García Higuera**, Investigadora del Instituto de Biología Funcional y Genómica

**CERTIFICAN:**

Que la memoria titulada “Regulación de la dinámica de replicación del DNA por APC-Cdh1 y sus consecuencias sobre la estabilidad del genoma” presentada por el licenciado D. Javier Garzón Hidalgo para optar al grado de Doctor en Farmacia por la Universidad de Salamanca, ha sido realizada bajo su dirección en el Centro Mixto de Biología Funcional y Genómica, CSIC-Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, firmamos el siguiente certificado en Salamanca,

a 9 de julio de 2015

Fdo. Sergio Moreno Pérez

Fdo. Irene García Higuera

El **Dr. D. Francisco del Rey Iglesias**, Catedrático del Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca

**CERTIFICA:**

Que la memoria titulada “Regulación de la dinámica de replicación del DNA por APC-Cdh1 y sus consecuencias sobre la estabilidad del genoma” presentada por el licenciado D. Javier Garzón Hidalgo para optar al grado de Doctor en Farmacia por la Universidad de Salamanca, ha sido realizada bajo la dirección del Dr. D. Sergio Moreno Pérez y de la Dra. D<sup>a</sup>. Irene García Higuera en el Centro Mixto de Biología Funcional y Genómica, CSIC-Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, firma el siguiente certificado en Salamanca,

a 9 de julio de 2015

Fdo. Francisco del Rey Iglesias





*“La verdadera ciencia enseña, por encima de todo,  
a dudar y a ser ignorante”*

*Miguel de Unamuno*



A decorative graphic consisting of a grid of thick black lines on a white background. The grid is composed of three vertical lines and three horizontal lines, creating a series of rectangular cells. The lines are of uniform thickness and intersect at right angles.

# *Índice*



<b>Índice</b> .....	3
<b>Abreviaturas</b> .....	11
<b>Introducción</b> .....	15
<b>1. Ciclo celular y Cdk</b> .....	17
<b>2. Ubiquitina-ligasas</b> .....	19
2.1. SCF ( <i>Skp1-Cul1-F-box-protein</i> ) .....	20
2.2. APC/C (Complejo promotor de la anafase o ciclosoma) .....	21
2.2.1. Composición .....	21
2.2.2. Reconocimiento de sustratos.....	22
2.2.3. APC/C-Cdc20 .....	24
<b>3. APC/C-Cdh1</b> .....	25
3.1. APC/C-Cdh1 en el ciclo mitótico .....	25
3.1.1. Activación de APC/C-Cdh1 .....	25
3.1.2. Transición mitosis-G1.....	26
3.1.3. APC/C-Cdh1 en G1 .....	27
3.1.4. Inactivación de Cdh1.....	28
3.2. APC/C-Cdh1 en diferenciación .....	29
3.2.1. Sistema nervioso .....	30
3.2.2. Gametogénesis .....	30
3.2.3. Miogénesis.....	31
3.2.4. Diferenciación del cristalino.....	31
3.3. APC/C-Cdh1 y el mantenimiento de la integridad cromosómica.....	32
3.4. APC/C-Cdh1 y supresión tumoral .....	33
3.5. APC/C-Cdh1 y el control del metabolismo celular .....	33
3.6. APC/C-Cdh1 y el control de la endorreplicación .....	34
<b>4. Replicación del DNA en eucariotas</b> .....	35
4.1. Etapas en la replicación .....	35
4.1.1. Inicio de la replicación.....	35

4.1.2. Elongación. Progresión de la horquilla de replicación .....	37
4.1.3. Terminación .....	38
4.2. Metabolismo de los dNTPs .....	38
4.2.1. Biosíntesis <i>de novo</i> .....	38
4.2.2. Vía de rescate.....	40
4.2.3. Catabolismo .....	40
4.3. Control de los niveles de dNTPs a lo largo del ciclo celular .....	40
4.3.1. Ribonucleótido reductasa (RNR) .....	40
4.3.2. Timidina quinasa (TK1) y timidilato quinasa (TMPK).....	43
4.3.3. Importancia Fisiológica de la Regulación de los Niveles de dNTPs .....	43
<b>5. Estrés Replicativo .....</b>	<b>45</b>
5.1. Causas de estrés replicativo.....	45
5.1.1. Anomalías en el licenciamiento y disparo de orígenes de replicación .....	45
5.1.2. Obstáculos físicos para el avance del replisoma .....	45
5.1.3. Interferencias entre la maquinaria de transcripción y la de replicación .....	46
5.1.4. Disponibilidad limitada de factores replicativos .....	47
5.2. Respuesta celular frente al estrés replicativo .....	48
5.3. Consecuencias del estrés replicativo .....	51
5.3.1. Inestabilidad genómica .....	51
5.3.2. Tumorigénesis .....	52
5.3.3. Envejecimiento.....	53
5.3.4. Otras enfermedades .....	53
<b>Objetivos .....</b>	<b>55</b>
<b>Material y Métodos .....</b>	<b>59</b>
<b>1. Ratones .....</b>	<b>61</b>
<b>2. Genotipado .....</b>	<b>61</b>
2.1. Extracción del DNA .....	61
2.2. PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) .....	62

<b>3. Cultivos celulares</b>	63
3.1. Establecimiento de cultivos primarios de MEFs (fibroblastos embrionarios murinos)	63
3.2. Infecciones con adenovirus	64
3.3. Sincronización celular en G0	65
3.4. Análisis de proliferación por incorporación de EdU	65
3.5. Tratamientos de las células en cultivo	66
<b>4. Ensayo de viabilidad celular</b>	66
<b>5. Ensayo de fibras de DNA (análisis de la dinámica de replicación)</b>	67
5.1. Medidas de la velocidad de progresión de la horquilla y la distancia entre orígenes	68
5.2. Análisis de la dinámica de replicación en eritroblastos de hígado fetal	68
<b>6. Estimación de la duración de la fase S (experimentos de doble pulso con CldU e IdU)</b>	69
<b>7. Cuantificación de los niveles intracelulares de dNTPs</b>	70
<b>8. Técnicas de proteínas</b>	71
8.1 Preparación de extractos proteicos a partir de células en cultivo	71
8.2 Cuantificación de la concentración de proteínas a partir del extracto total	71
8.3. Inmunodetección por <i>Western Blot</i>	71
a. Preparación de muestras	71
b. Electroforesis de proteínas en SDS-PAGE	72
c. Transferencia de proteínas	72
d. Inmunodetección de proteínas	73
8.4. Inmunodetección de proteínas en cromatina. Fraccionamientos subcelulares	73
<b>9. Inmunofluorescencia celular</b>	74
<b>10. Ensayo del cometa</b>	77
<b>11. Microscopía</b>	78
11.1 Microscopía de contraste de fases	78
11.2. Microscopía de fluorescencia	78
<b>12. Citometría de flujo</b>	79

<b>13. Tratamiento de datos y análisis estadísticos .....</b>	<b>80</b>
<b>Resultados .....</b>	<b>81</b>
<b>1. Papel de Cdh1 en el mantenimiento de la estabilidad genómica .....</b>	<b>83</b>
1.1. La ausencia de Cdh1 incrementa las roturas de doble cadena (DSBs) en el DNA ...	83
1.2. La pérdida de Cdh1 determina la aparición de otras evidencias de daño en el DNA .....	88
1.3. El paso por fase S de los MEFs deficientes en Cdh1 determina la aparición de los signos de daño en el DNA .....	90
1.4. Las células carentes de Cdh1 muestran una activación moderada de la ruta de respuesta a daño.....	92
1.5. Los MEFs deficientes en Cdh1 muestran una mayor sensibilidad a determinados compuestos genotóxicos que interfieren con la replicación.....	95
<b>2. La ausencia de Cdh1 provoca estrés replicativo.....</b>	<b>97</b>
2.1. APC/C-Cdh1 contribuye a garantizar una replicación eficiente.....	98
2.2. La pérdida de Cdh1 disminuye la velocidad de progresión de las horquillas de replicación y reduce la distancia entre orígenes de replicación adyacentes.....	99
2.3. La ralentización de las horquillas replicativas en ausencia de Cdh1 no es consecuencia del aumento de orígenes activados.....	101
2.4. Las células que carecen de Cdh1 evidencian una fase S más prolongada.....	104
2.5. La carga cromatínica de los complejos pre-replicativos no se ve disminuida en ausencia de Cdh1.....	106
<b>3. APC/C-Cdh1 garantiza la eficiencia de la replicación mediante el control de las reservas intracelulares de dNTPs .....</b>	<b>109</b>
3.1. El aporte exógeno de dNTPs/nucleósidos corrige los defectos replicativos de los MEFs mutantes .....	109
3.2. La adición de nucleótidos rescata parcialmente el fenotipo de inestabilidad genética en células deficientes en Cdh1 .....	112
3.3. Cuantificación de los niveles intracelulares de dNTPs en las células carentes en Cdh1.....	115
3.4. La ausencia de Cdh1 origina perturbaciones en la degradación de enzimas implicadas en la biosíntesis de dNTPs.....	117
<b>4. Influencia de la actividad Cdk sobre los defectos replicativos en las células deficientes en Cdh1.....</b>	<b>119</b>



4.1. Caracterización de MEFs doblemente deficientes en Cdh1 y Skp2 .....	119
4.2. Efecto de la inhibición química de la actividad Cdk en MEFs deficientes en Cdh1 .....	122
<b>Discusión .....</b>	<b>125</b>
1. Inestabilidad genómica.....	127
2. Defectos en la dinámica de replicación .....	130
3. Corrección del fenotipo de estrés replicativo mediante la adición de dNTPs.....	131
4. Origen del problema: reservas intracelulares de dNTPs.....	133
5. Desregulación de enzimas implicadas en las rutas de síntesis de dNTPs .....	134
6. Papel del exceso de actividad Cdk sobre los defectos replicativos .....	137
6.1. Licenciamiento de orígenes .....	137
6.2. Activación de factorías de replicación y disparo de orígenes.....	139
<b>Conclusiones .....</b>	<b>143</b>
<b>Bibliografía .....</b>	<b>147</b>
<b>Agradecimientos .....</b>	<b>173</b>



# *Abreviaturas*



**APC/C:** *Anaphase Promoting Complex-Cyclosome*, complejo promotor de la anafase-ciclosoma.

**ASK:** *Activator of S phase Kinase*.

**ATM:** *Ataxia Telangiectasia Mutated*.

**ATP:** Adenosín trifosfato.

**ATR:** *ATM and Rad3 Related*.

**ATRIP:** *ATR Interacting Protein*, proteína de interacción con ATR.

**BRCA2:** *Breast Cancer type 2 susceptibility protein*.

**Cdc6:** *Cell division control protein 6*.

**Cdc20:** *Cell-division cycle protein 20*.

**Cdh1:** *Cdc20-homolog 1*.

**CDK:** *Cyclin-Dependent Kinase*, quinasa dependiente de ciclina.

**Chk1:** *Checkpoint Kinase 1*.

**CFS:** *Common Fragile Sites*, sitios frágiles.

**CKI:** *Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor*, inhibidor de Cdk.

**CKS:** *Cyclin-dependent Kinase regulatory Subunit*.

**CldU:** 5-cloro-2'-desoxiuridina.

**CMG:** Complejo Cdc45-MCM2-7-GINS.

**DDK:** *Dbf4-dependent Kinase*.

**DDT:** *DNA Damage Tolerance*, ruta de tolerancia al daño.

**DNA:** Ácido desoxirribonucleico.

**dNTPs:** 2'-deoxirribonucleósidos-5'-trifosfato.

**DMEM:** *Dulbecco's Modified Eagle Medium*.

**DMSO:** Dimetilsulfóxido.

**DSBs:** *Double Strand Breaks*, roturas de doble cadena en el DNA.

**DTT:** Ditioneitol.

**EDTA:** Ácido etilendiaminotetraacético.

**EdU:** 5-etinil-2'-desoxiuridina.

**ERFS:** *Early Replicating Fragile Sites*, sitios frágiles de replicación temprana.

**FACS:** *Fluorescence Activated Cell Sorting*.

**FBS:** Suero bovino fetal.

**Fzr:** *Fizzy-related protein homolog*.

**GINS:** *Go, Ichi, Ni, San*. Del japonés cinco, uno, dos, tres.

**Gls1:** Glutaminasa 1.

**HPLC:** *High-Performance Liquid Chromatography*, cromatografía líquida de alto rendimiento.

## Abreviaturas

**HU:** Hidroxiurea.

**IdU:** 5-iodo-2'-desoxiuridina.

**MEFs:** *Mouse Embryonic Fibroblasts*, fibroblastos embrionarios murinos.

**MCM:** *Mini-Chromosome Maintenance*.

**MMC:** Mitomicina-C.

**NHEJ:** *Non-Homologous End Joining*.

**OIS:** *Oncogene Induced Senescence*, senescencia inducida por oncogenes.

**ORC:** *Origin Recognition Complex*, complejo de reconocimiento de orígenes.

**PBS:** *Phosphate Buffered Saline*.

**PCNA:** *Proliferating Cell Nuclear Antigen*.

**PCR:** *Polymerase Chain Reaction*, reacción en cadena de la polimerasa.

**PF:** Paraformaldehído.

**PFKFB3:** 6-fosfofructo-2-quinasa/fructosa-2,6-bisfosfatasa-isoforma 3.

**PI3K:** Fosfoinositol 3-quinasas.

**Plk1:** *Polo-like kinase 1*, quinasa de tipo polo 1.

**Pre-RC:** *Pre-Replicative Complex*, complejo pre-replicativo.

**Rb:** proteína del retinoblastoma.

**RFC:** Factor de replicación C.

**RNA:** Ácido ribonucleico.

**RNR:** Ribonucleótido reductasa.

**ROS:** *Reactive Oxygen Species*, especies reactivas de oxígeno.

**RPA:** *Replication Protein A*, proteína de replicación A.

**RRM1, RRM2:** Ribonucleótido reductasa M1, ribonucleótido reductasa M2.

**SAC:** *Spindle Assembly Checkpoint*, punto de control del huso mitótico.

**SCF:** *Skp1-Cullin1-F box complex*.

**SDS:** Dodecilsulfato sódico.

**Skp2:** *S-phase kinase-associated protein 2*.

**ssDNA:** *Single Stranded DNA*, DNA de cadena sencilla.

**TBS:** *Tris Buffered Saline*.

**TGF- $\beta$ :** Factor de crecimiento transformante beta.

**TK1:** Timidina quinasa.

**TMPK:** Timidilato quinasa.

**UVA:** Ultravioleta de onda larga.

A decorative background consisting of a grid of thick black lines. There are two vertical lines on the left side and two horizontal lines across the middle, creating a minimalist geometric pattern.

# *Introducción*





## 1. Ciclo celular y Cdk

El ciclo de división celular es el conjunto ordenado de eventos por el cual una célula duplica su material genético para posteriormente transmitirlo (repartirlo) equitativamente a las dos células hijas resultantes. Tradicionalmente se divide al ciclo celular en distintas fases. La mitosis es la etapa en la que se produce la distribución de un juego completo de cromátidas hermanas a cada uno de los dos núcleos y se continúa con la citoquinesis o división del citoplasma para dar lugar a dos células independientes. En el período restante, conocido como interfase, destaca la fase S o fase de síntesis del DNA, en la cual la célula genera una copia exacta y completa de su genoma, y las fases G1 y G2, que preceden y siguen a la fase S, y que constituyen etapas de crecimiento y preparación celular para afrontar, en condiciones óptimas, la fase de síntesis y de división, respectivamente.

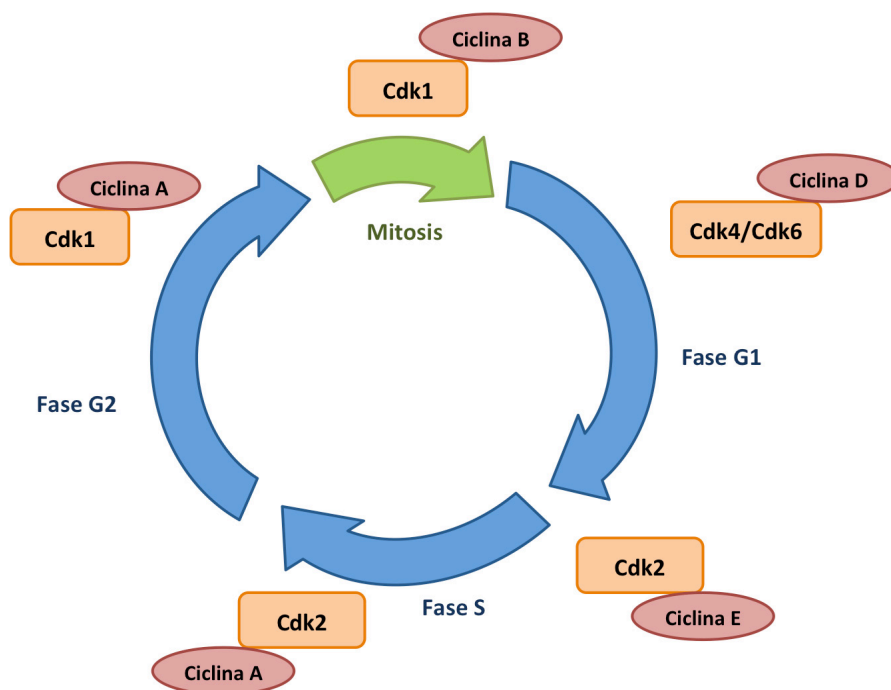
La progresión ordenada de sucesos en el ciclo celular está coordinada fundamentalmente por la actividad cíclica de unas quinasas, las Cdk o quinasas dependientes de ciclinas. Como su propio nombre indica, estas serina/treonina quinasas están funcionalmente reguladas por unas proteínas que interaccionan físicamente con ellas y cuyos niveles oscilan a lo largo del ciclo, las ciclinas. A diferencia de lo que ocurre en levaduras, donde una única Cdk (Cdc28 en *Saccharomyces cerevisiae*, Cdc2 en *Schizosaccharomyces pombe*) regula todo el ciclo celular asociándose con distintas ciclinas (Nasmyth, 1993), en mamíferos existen varias Cdk. Cuatro de ellas están directamente implicadas en la progresión del ciclo: la Cdk mitótica Cdk1 y las interfásicas Cdk4, Cdk6 y Cdk2 (Malumbres y Barbacid, 2011).

En presencia de señales mitogénicas, se induce la expresión de ciclinas D en G1, lo que estimula su unión a Cdk4 y Cdk6. La labor fundamental de los complejos ciclina D-Cdk4 y ciclina D-Cdk6 es iniciar la fosforilación inactivadora de Retinoblastoma (Rb), que actúa como represor transcripcional de entrada en ciclo a través de su interacción inhibitoria con E2F (factor de transcripción necesario para disparar todo el programa de expresión génica requerido para la fase de síntesis del DNA) y de su unión a factores que modifican la estructura de la cromatina (deacetilasas y metiltransferasas de histonas, por ejemplo) (Luo *et al.*, 1998; Harbour y Dean, 2000). La inactivación parcial de Rb, dependiente de ciclina D-Cdk4/Cdk6, promueve la expresión de ciclina E, que tras asociarse con Cdk2, completará la fosforilación de Rb, permitiendo así la transcripción de genes necesarios para la transición desde G1 a fase S. A medida que la replicación avanza, la ciclina E será progresivamente sustituida por la ciclina A que, unida a Cdk2, permitirá el avance hacia la fase G2. Por último, tanto el inicio como el desarrollo de la mitosis está controlada por Cdk1. Ésta, asociada en primer término con la ciclina A y posteriormente con la ciclina B1, promueve la fosforilación de numerosos sustratos que serán necesarios para que se sucedan los eventos propios de la fase mitótica: ruptura de

## Introducción

la membrana nuclear, compactación y condensación de los cromosomas, formación del huso mitótico, etc. (Malumbres y Barbacid, 2009; Satyanarayana y Kaldis, 2009).

Curiosamente, estudios relativamente recientes han demostrado que Cdk1 es la única Cdk esencial en el ciclo celular de mamíferos. Si bien en ratón la ausencia constitutiva de las Cdk interfásicas (Cdk2, Cdk4 y Cdk6) provoca defectos en el desarrollo de determinados tejidos especializados, su acción es dispensable y está compensada por Cdk1, que garantiza un ciclo celular funcional (Santamaría *et al.*, 2007).



**Figura Introducción 1.** Esquema del ciclo celular eucariota, en el que se muestran las distintas fases del mismo con los diferentes complejos ciclina-Cdk que participan en la progresión de cada una de las etapas.

Resulta vital controlar estrechamente la progresión a lo largo del ciclo celular para que cada una de las fases comience cuando debe hacerlo y no se anticipe o retrase en el tiempo. Para asegurar esto, las células eucariotas poseen *checkpoints* o puntos de control, que representan sistemas de verificación para comprobar si se cumplen o no las condiciones necesarias para que la célula progrese de una fase a otra en el ciclo. En caso negativo, se desencadena una respuesta celular para ralentizar transitoriamente el ciclo y corregir las anomalías que hayan impedido la progresión. Los puntos de control del ciclo celular no solo se sitúan en las transiciones G1/S y G2/M, sino también a lo largo de la fase S (*checkpoint* de fase S) y en mitosis (*checkpoint* de ensamblaje del huso o SAC) (Vermeulen *et al.*, 2003).

Del mismo modo, es esencial contar con mecanismos finos de control de la tasa de división celular para evitar fenómenos de proliferación descontrolada que pudieran facilitar el desarrollo de tumores. Por eso, al margen de la necesaria asociación de las Cdk con las distintas ciclinas, existen niveles adicionales de regulación de la actividad Cdk. Así, para alcanzar su plena actividad, las Cdk deben ser fosforiladas en un residuo de treonina por una quinasa activadora de Cdk (CAK). También están sujetas a fosforilaciones inhibitorias que reprimen su actividad, mediadas por las quinasas Wee1 y Myt1, que a su vez se ven contrarrestadas por la acción de las fosfatasas Cdc25 (Cdc25A, Cdc25B y Cdc25C) (Perry y Kornbluth, 2007). Por otro lado, existen proteínas capaces de interaccionar con los complejos ciclina-Cdk inhibiendo su actividad. Son las proteínas inhibidoras de Cdk (CKIs), que se agrupan en dos familias: los inhibidores de la familia de INK4 (p15, p16, p18 y p19) y los de la familia Cip/Kip, entre los que se encuentran p21, p27, y p57 (Besson *et al.*, 2008).

En todo caso, por encima de estos mecanismos de regulación está el control de los niveles de las propias ciclinas y de otros reguladores de ciclo a lo largo de las distintas etapas por las que transita la célula, ejercido en buena medida a través de su degradación proteolítica inducida por ubiquitinación y mediada por el proteasoma en momentos concretos del ciclo.

## 2. Ubiquitina-ligasas

El nivel de una proteína concreta en el interior de la célula depende del balance entre su tasa de síntesis y de degradación proteolítica. La vía principal de degradación de las proteínas reguladoras del ciclo celular es la denominada ruta de la ubiquitina-proteasoma, que permite la eliminación selectiva de proteínas que han sido marcadas previamente con ubiquitina. La ubiquitina, un polipéptido de 79 aminoácidos, se une a través de un enlace peptídico al grupo  $\alpha$ -amino de un residuo de lisina de la proteína diana. La ubiquitinación es catalizada por una secuencia de reacciones en la que participan tres enzimas: E1, E2 y E3 (Nakayama y Nakayama, 2006).

La E1 o enzima activadora de ubiquitina, es capaz de unir una molécula de ubiquitina (con gasto de ATP) y de transferirla a una E2 (enzima conjugadora de ubiquitina) a través de un enlace tioéster. Seguidamente, entra en juego la E3 o ubiquitina-ligasa, con sitios de reconocimiento para la E2 y para el sustrato específico, favoreciendo la transferencia de la ubiquitina a la proteína aceptora. Generalmente, para que la proteína diana sea reconocida por el proteasoma 26S se requiere la formación de una cadena de poli-ubiquitina. Dado que la ubiquitina posee siete residuos de lisina en su secuencia, la conjugación de cada nueva

molécula puede realizarse en distintos puntos, dando lugar a cadenas de poli-ubiquitina de diversa longitud y complejidad. Son, sin embargo, las cadenas de poli-ubiquitina generadas a través de los residuos de Lys11 y Lys48 las que tradicionalmente son reconocidas por el proteasoma 26S. Otras asociaciones, como las que se producen sobre los residuos de Lys63 de la ubiquitina, se han vinculado con la estabilización de interacciones interproteicas necesarias en algunas rutas de señalización. Finalmente, la proteína poli-ubiquitinada será degradada por el macro-complejo proteico del proteasoma con gasto de ATP, recuperándose las subunidades de ubiquitina, que podrán ser recicladas para el marcaje de nuevos sustratos (Pines, 2011; Mocciaro y Rape, 2012; Sivakumar y Gorbisky, 2015).

La especificidad del sustrato ubiquitinado viene determinada por el tipo de E3 ubiquitina-ligasa que participa en la reacción, existiendo una amplia variedad de estas proteínas E3 en el interior de la célula. Por su papel en la degradación de importantes reguladores del ciclo celular, nos centraremos en el complejo SCF y el complejo APC/C o ciclosoma (Nakayama y Nakayama, 2006; Sarikas *et al.*, 2011).

### 2.1. SCF (*Skp1-Cul1-F-box-protein*)

El complejo SCF está constituido por tres componentes fijos (Rbx1, Cul1 y Skp1) y por una subunidad variable, una proteína con una caja F (*F-box protein*) responsable de mediar el reconocimiento del sustrato. La interacción entre esta última y el resto del complejo SCF se realiza a través de Skp1.

El número de proteínas con este dominio de tipo F que pueden asociarse a SCF es amplio. Entre ellas se encuentran Fbw7 (que promueve la degradación de Ciclina E, Myc y Notch entre otros),  $\beta$ -Trcp1 (que favorece la ubiquitinación de Cdc25, Wee1 o Emi1) y Skp2 (Cardozo y Pagano, 2004; Nakayama y Nakayama, 2006).

Centrándonos en *Skp2*, su expresión se induce al inicio de la fase S, siendo diana del factor de transcripción E2F (Zhang y Wang, 2006). Entre los sustratos del complejo SCF-Skp2 cabe destacar a p27, p21, y p57, todas ellas proteínas inhibidoras de las Cdk (CKIs). Desde el punto de vista fisiológico, p27 parece ser el sustrato más relevante de Skp2. De hecho, utilizando modelos de ratón, se ha comprobado *in vivo* que la delección adicional de p27 es capaz de revertir las principales alteraciones asociadas a la deficiencia en Skp2 (aumento del tamaño celular y nuclear, poliploidía, defectos proliferativos, incremento en el número de centrosomas) (Nakayama *et al.*, 2000; Zhu, 2010; Kossatz *et al.*, 2004). Como ocurre con la mayoría de

sustratos del complejo SCF, la ubiquitinación de p27 requiere una fosforilación previa, en este caso en el residuo de treonina 187, mediada por los complejos ciclina E/ciclina A-Cdk2 (Carrano *et al.*, 1999). En ausencia de Skp2 la estabilización de p27 estimula su función inhibitoria sobre los complejos Cdk, fundamentalmente sobre ciclina E-Cdk2, interfiriendo de esta forma en la transición hacia la fase S. El papel clave de Skp2 en la regulación de los niveles de p27, sugiere que este componente del complejo SCF podría comportarse como un oncogén, ya que, simplificando, la consecuencia postrera de su sobre-expresión o hiper-activación sería la estimulación de la proliferación celular. Existen, de hecho, diversos estudios que avalan esta teoría (Gstaiger *et al.*, 2001; Zhu *et al.*, 2004; Sanada *et al.*, 2004; Shim *et al.*, 2003).

De manera general, se puede afirmar que el control del complejo SCF sobre el ciclo celular está restringido a las fases S y G2. En mitosis y G1, el recambio proteico de la mayoría de reguladores de ciclo va a ser dependiente del complejo APC/C.

## 2.2. APC/C (Complejo promotor de la anafase o ciclosoma)

El complejo APC/C es la otra E3 ubiquitina-ligasa clave en la regulación del ciclo celular, puesto que su actividad es indispensable para garantizar una salida apropiada de mitosis en células proliferantes.

### 2.2.1. Composición

APC/C es un complejo multiproteico altamente conservado a lo largo de la evolución formado por entre 15 y 17 subunidades distintas, dependiendo del organismo estudiado (ver **Tabla 1**). Sin embargo, para ser funcional debe unirse, además, a una proteína adicional que actúa como cofactor o coactivador. En el ciclo mitótico existen dos cofactores : Cdc20 y Cdh1 (cuyo nombre génico en mamíferos es *Fzr1*), que son los responsables de la presentación específica del sustrato para su ubiquitinación. Estructuralmente, comparten la presencia de un dominio con repeticiones WD40 a través del cual se establece la interacción con las moléculas diana. Además, poseen al menos otros tres motivos necesarios para su acoplamiento al complejo APC/C: la caja C y el motivo KILR hacia el extremo N-terminal; y el motivo IR (isoleucina-arginina), en el extremo C-terminal, que interacciona con la subunidad APC3 (Sivakumar y Gorbisky, 2015; Castro *et al.*, 2005; Peters, 2006; Pines, 2011; Primorac y Musacchio, 2013):

Proteína en vertebrados	Proteína en <i>S. cerevisiae</i>	Motivos estructurales	Función
APC1	Apc1	Repeticiones PC	Andamiaje
APC2	Apc2	Dominio culina	Catalítica. Unión a la UBE2S
APC3	Cdc27	Motivos TPR	Andamiaje. Unión a APC10 y a los coactivadores
APC4	Apc4		Andamiaje
APC5	Apc5	Motivos TPR	Andamiaje
APC6	Cdc16	Motivos TPR	Andamiaje
APC7		Motivos TPR	Andamiaje
APC8	Cdc23	Motivos TPR	Andamiaje. Unión a CDC20
APC9	Apc9		Estabiliza a APC3
APC10	Doc1	Dominio Doc	Forma parte del receptor de reconocimiento (caja D)
APC11	Apc11	Dedo RING	Catalítica. Unión a enzima E2
APC12	Cdc26		Estabiliza a APC6
APC13	Swm1		Estabiliza a APC3, APC6 y APC8
APC15	Mnd2		Promueve ubiquitinación de CDC20
APC16			Estabiliza APC3 y APC7
<b>Cofactores</b>			
CDC20	Cdc20	WD40, cola IR, caja C	Reconocimiento de sustratos
CDH1	Cdh1 (Htc1)	WD40, cola IR, caja C	Reconocimiento de sustratos

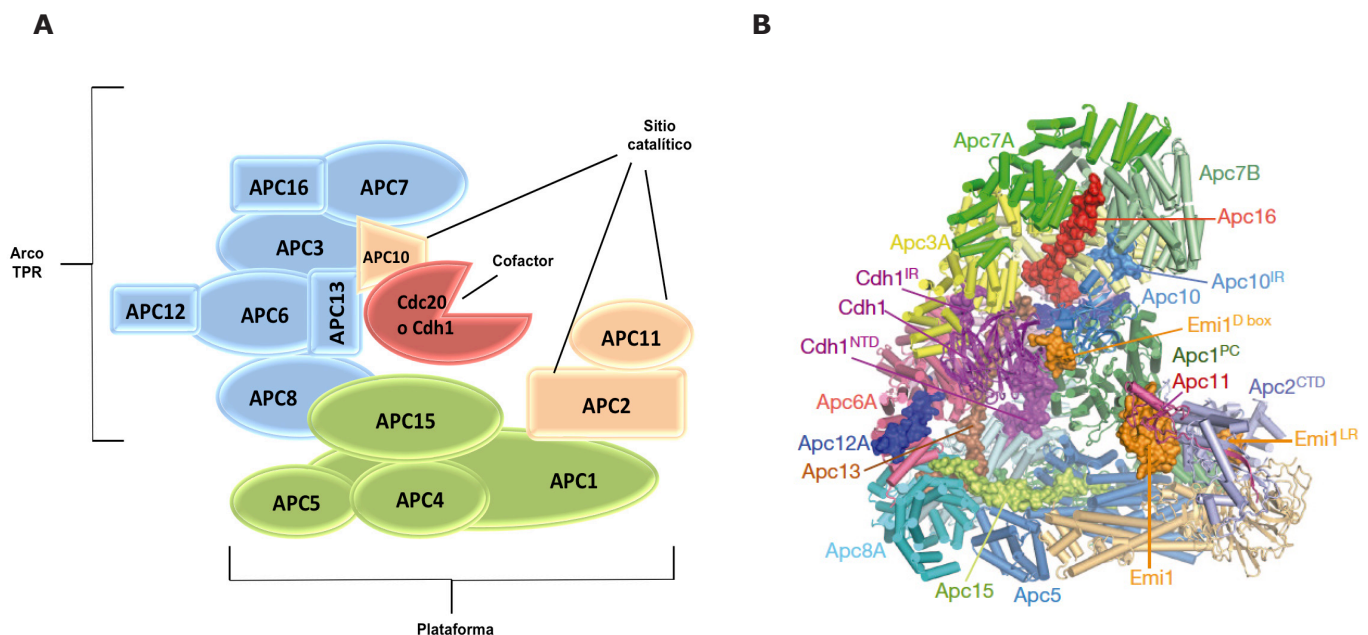
**Tabla 1. Subunidades del complejo APC/C, incluyendo los dos cofactores.** Se recogen las proteínas del complejo en vertebrados, sus homólogas en *S. cerevisiae*, los rasgos estructurales más típicos de cada subunidad y las funciones conocidas de cada una de ellas.

### 2.2.2. Reconocimiento de sustratos

Para que las proteínas sustrato del complejo APC/C sean identificadas por los coactivadores deben poseer una secuencia de reconocimiento. Los dos motivos principales de reconocimiento por el complejo APC/C son las denominadas caja D (cuya secuencia consenso es RXXLXXXXN) y caja KEN (KENXXXXN) (Pfleger y Kirschner, 2000). Además de estas secuencias de reconocimiento mayoritarias, también se han identificado otras secuencias que aparecen en algunos sustratos, como la caja O y la caja G (con similitudes a la caja D y a la KEN, respectivamente) y la caja A,

presente en la quinasa Aurora A (Peters, 2006; Pines, 2011; Sivakumar y Gorbsky, 2015). Por otra parte, parece que, al menos en algunos casos, además del motivo de reconocimiento es necesaria la presencia de otra secuencia cercana o de un motivo adicional para que se produzca la interacción con el complejo APC/C-coactivador. Éste sería el caso de la ciclina A, que necesita de la presencia de un cofactor CKS (*Cyclin-dependent Kinase regulatory Subunit*) para que se produzca su unión al complejo APC/C (Di Fiore y Pines, 2010).

En todo caso, parece claro que los sustratos no solo interaccionan con el coactivador. Así, en el caso de APC/C-Cdh1 se ha comprobado que la unión de la proteína diana se produce en una pequeña hendidura generada entre Cdh1 y la subunidad APC10 (subunidad con un dominio Doc). De esta forma, el sustrato interacciona por un lado, a través de su secuencia de reconocimiento, con los dominios WD40 de Cdh1, y por el otro lado, con APC10 (da Fonseca *et al.*, 2011; revisado en Pines, 2011; Primorac y Musacchio, 2013; Sivakumar y Gorbsky, 2015).



**Figura Introducción 2. Organización estructural de APC/C.** **A.** Esquema de las subunidades que componen el complejo. Se diferencian con distinto color cada uno de los subcomplejos funcionales. El módulo de subunidades con repeticiones TPR (en azul) aporta funciones estructurales, de andamiaje, al conjunto. La plataforma del complejo (en verde), con APC1 como subunidad más grande, sirve de nexo de unión entre el arco de subunidades TPR y la parte catalítica (en naranja). En esta última, APC11 favorece la interacción con las enzimas del tipo E2; y APC10 forma parte de la región de unión al sustrato. Asimismo, se muestra el lugar donde Cdc20 o Cdh1 (en rojo) se unen al complejo y permiten el reconocimiento de las dianas. **B.** Estructura atómica de APC/C-Cdh1 obtenida a partir de estudios de microscopía electrónica (Chang *et al.*, 2015).



### 2.2.3. APC/C-Cdc20

La principal función de APC/C-Cdc20 es favorecer la transición de metafase a anafase a través de la degradación de securina y de ciclina B (Hagting *et al.*, 2002; Thornton y Toczyski, 2003).

Para que se produzca la unión de Cdc20 a APC/C, este último debe estar fosforilado en algunas de sus subunidades por la acción del complejo ciclina B1-Cdk1. Alternativamente, algunos autores sugieren que la fosforilación de APC/C mediada por Plk1 también podría activar al complejo en mitosis (Kotani *et al.*, 1998), si bien es cierto que la inhibición de esta quinasa no evita que la E3 ubiquitín ligasa sea funcional. Sin embargo, la degradación de los dos sustratos fundamentales de APC/C-Cdc20 no se puede iniciar hasta que se haya producido el correcto alineamiento y anclaje de todos los cromosomas a los microtúbulos del huso mitótico. De esta forma se evita el inicio prematuro de la anafase y una segregación cromosómica desigual. Esta inhibición sobre Cdc20 está mediada por las proteínas del SAC (*Spindle Assembly Checkpoint*), que forman un complejo sobre los cinetocoros que se encuentran libres, no enlazados todavía a los microtúbulos. Entre las proteínas que forman parte del SAC podemos mencionar a Mad1, Mad2, BubR1 o Bub3 (Van Leuken *et al.*, 2008; Peters, 2006; Pines, 2011; Manchado *et al.*, 2006). Estas proteínas se unen a Cdc20 libre secuestrándolo e impidiendo su asociación a APC/C (De Antoni *et al.*, 2005; Kulukian *et al.*, 2009), o bien se unen como pseudosustrato al complejo APC/C-Cdc20 interfiriendo en el reconocimiento de las proteínas diana de Cdc20 (Sudakin *et al.*, 2001).

Así pues, no es hasta que está establecida la placa metafásica e inactivado el SAC cuando se produce la liberación de Cdc20 y se inicia la ubiquitinación de ciclina B1 y securina. Ambas proteínas actúan inhibiendo a la separasa, la ciclina tanto por interacción física como por fosforilación inhibitoria a través de Cdk1 y la securina por interacción directa (Stemmann *et al.*, 2001; Hellmuth *et al.*, 2015; Waizenegger *et al.*, 2002). De esta forma, la degradación de los dos sustratos mediada por APC/C-Cdc20 permitirá a la separasa romper las uniones de cohesina establecidas entre las cromátidas hermanas (a nivel de la subunidad Rad21 del complejo de cohesina), permitiendo la entrada de la célula en anafase (revisado en Peters, 2006; Manchado *et al.*, 2006; Pines, 2011; Sivakumar y Gorbsky, 2015).

No obstante, existen al menos dos sustratos de APC/C-Cdc20 cuya degradación no se ve afectada por la inhibición de las proteínas del SAC. Se trata de ciclina A y Nek2. En este caso se sabe que su ubiquitinación se inicia coincidiendo con la desintegración de la membrana nuclear, es decir, antes de metafase. Esta degradación independiente del silenciamiento del SAC podría explicarse por la presencia en estas dianas de motivos alternativos de reconocimiento diferentes a las secuencias canónicas tipo KEN y D que se unen a Cdc20 con alta afinidad y



compiten con las proteínas del SAC (Di Fiore y Pines, 2010; Hayes *et al.*, 2006).

Una vez que la extensa degradación proteolítica de ciclina B mediada por APC/C-Cdc20 origina una caída de la actividad Cdk mitótica, se posibilitará la entrada en escena de Cdh1, el otro coactivador de APC/C. Por su relevancia para este trabajo, describiremos con detalle todo lo referente al complejo APC/C-Cdh1 en una sección independiente.

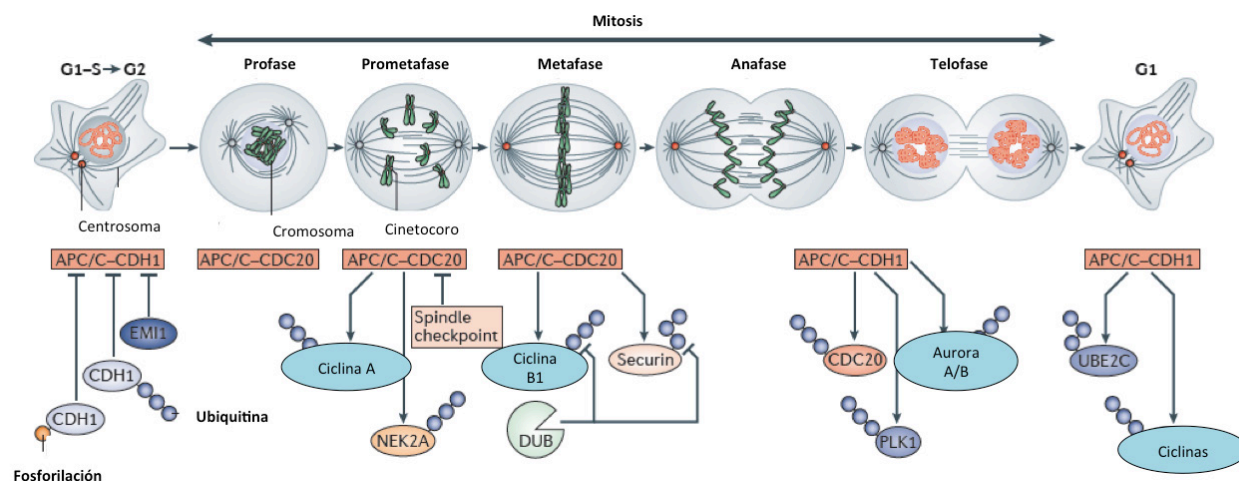
### **3. APC/C-Cdh1**

#### **3.1. APC/C-Cdh1 en el ciclo mitótico**

##### **3.1.1. Activación de APC/C-Cdh1**

La fosforilación dependiente de Cdks que mantiene inactivo a Cdh1 va a ser superada en anafase. Por una parte, los niveles de ciclina B van a disminuir como consecuencia de su degradación por APC/C-Cdc20. Por otra parte, aunque en mamíferos no está demasiado claro, al menos en levaduras se ha descrito que la fosfatasa Cdc14, que había permanecido secuestrada en el nucleolo, se activa, catalizando la eliminación de los residuos fosforilados de Cdh1 y favoreciendo consecuentemente su unión al complejo APC/C (Shirayama *et al.*, 1999). Esta unión va a estar promovida por el hecho de que el propio APC/C-Cdh1 marca a Cdc20 para su degradación proteolítica, generándose así el recambio de un cofactor por otro (revisado en Peters, 2006; Pines, 2011; Manchado *et al.*, 2006; Sivakumar y Gorbsky, 2015). Adicionalmente, se ha comprobado que una fracción mitótica de Cdh1 permanece secuestrada por una proteína similar a Mad2 (Mad2L2), cuya degradación en anafase contribuye a la liberación de Cdh1 y a su activación del complejo APC/C (Listovsky y Sale, 2013).

A diferencia de lo que ocurre con Cdc20, la lista de sustratos de APC/C-Cdh1 es muy extensa y aún se siguen identificando nuevos candidatos. Actualmente se conocen más de 70 sustratos de este complejo que incluyen proteínas con funciones muy diversas, que van desde la regulación del ciclo celular a la participación en la diferenciación tisular de determinadas estructuras, pasando por el control en la biosíntesis de diversos metabolitos, entre otras. Algunas de las principales dianas moleculares de APC/C-Cdh1 están recogidas, junto a sus funciones, en la **Tabla 2**.



**Figura Introducción 3. Progresión celular a través de mitosis.** Sucesión de eventos que ocurren a nivel celular en las distintas fases de mitosis con su correspondiente correlación con respecto a la actividad APC/C. APC/C-Cdc20 permanece activo hasta metafase, cuando promueve la degradación de securina y ciclina B1 (hasta ese momento inhibida por el SAC) para que se produzca la segregación cromosómica. A partir de ese momento se activa Cdh1, que posibilitará la compleción mitótica gracias a la ubiquitinación de Cdc20 y de varias quinasas mitóticas (aurora A y B, Plk1). (Modificado de Sivakumar y Gorbsky, 2015).

### 3.1.2. Transición mitosis-G1

Además de Cdc20, las ciclinas A y B y algunas quinasas mitóticas (Aurora A, Plk1, Nek2) también van a ser degradadas por el complejo APC/C-Cdh1, facilitando la progresión desde anafase y la entrada en un nuevo ciclo celular. La quinasa Aurora A favorece la duplicación y separación del centrosoma en profase y ayuda a establecer la estructura del huso mitótico. Plk1 (o quinasa de tipo polo 1) participa en la fosforilación de sustratos que inducen la entrada en mitosis, entre los que parece encontrarse el propio APC/C. En cuanto a Nek2, se trata de una quinasa que también parece estar implicada en la separación del centrosoma (Castro *et al.*, 2005; Pines, 2011; Manchado *et al.*, 2006). La ausencia de Cdh1 en levaduras y células de mamífero no altera significativamente la duración de la mitosis, lo que permite concluir que APC/C-Cdh1 no es necesario para completar la salida de mitosis. De hecho, en experimentos de depleción de Cdh1 en células humanas, los únicos de sus sustratos mitóticos que parecen estabilizarse son las aurora quinasas (Floyd *et al.*, 2008). Presumiblemente, la persistencia de Cdc20 ante la deficiencia de Cdh1 compensa la actividad ubiquitinadora de APC/C en estas células (Pines, 2011; Sivakumar y Gorbsky, 2015).

Sustrato	Funciones celulares
<b>Ciclina A2</b>	Regulación de la fase S y de la transición G2/M
<b>Ciclina B1</b>	Regulación de la transición G2/M y de la progresión mitótica
<b>Aurora A</b>	Segregación cromosómica y citoquinesis
<b>Aurora B</b>	Segregación cromosómica y citoquinesis
<b>Plk1</b>	Regulador mitótico
<b>Nek2</b>	Separación del centrosoma
<b>Cdc20</b>	Coactivador mitótico de APC/C
<b>Id2</b>	Crecimiento axonal en neuronas
<b>CtIP</b>	Reparación de dobles roturas en el DNA
<b>Geminina</b>	Proteína inhibidora de Cdt1
<b>Cdc6</b>	Licenciamiento de orígenes de replicación
<b>Skp2</b>	Cofactor del complejo SCF
<b>TK1</b>	Síntesis de dTTP (vía de rescate)
<b>TMPK1</b>	Síntesis de dTTP (vía de rescate)
<b>RRM2</b>	Biosíntesis de novo de dNTPs
<b>PFKFB3</b>	Enzima glicolítica
<b>GLS1</b>	Enzima del metabolismo de la glutamina

**Tabla 2. Principales sustratos del complejo APC/C-Cdh1 con una breve descripción de sus funciones.**

### 3.1.3. APC/C-Cdh1 en G1

Una de las principales funciones del complejo APC/C-Cdh1 en la fase G1 es mantener un periodo de baja actividad Cdk para que la célula pueda prepararse adecuadamente para la subsiguiente fase de duplicación del DNA. Esto lo consigue a través de varios mecanismos complementarios:

- La ubiquitinación de las ciclinas A y B, cuya degradación reduce la actividad de las quinasas con las que forman complejo (Brandeis y Hunt, 1996; revisado en Eguren *et al.*, 2011).
- La ubiquitinación de Skp2, uno de los componentes del complejo SCF, que como ya se ha mencionado, promueve, a su vez, la ubiquitinación de los inhibidores de Cdk p27, p21 y p57.

De este modo se consigue estabilizar estos CKIs e inhibir de forma más específica los complejos ciclina-Cdk interfásicos (Bashir *et al.*, 2004; Wei *et al.*, 2004).

- La ubiquitinación de Cdc25A, la fosfatasa activadora de los complejos Cdk, cuya degradación también contribuye a limitar la actividad Cdk (Donzelli *et al.*, 2002).

En levaduras se ha comprobado que el licenciamiento de orígenes de replicación, es decir el ensamblaje de los complejos pre-replicativos (pre-RCs) en los orígenes, requiere un periodo de baja actividad Cdk (Tanaka y Diffley, 2002) que sin duda, APC/C-Cdh1 contribuye a mantener. Pero además, APC/C-Cdh1 promueve la degradación de dos factores críticos para el ensamblaje de los citados complejos : geminina y Cdc6 (Petersen *et al.*, 2000; Skar y Pagano, 2008; Clijsters *et al.*, 2013). Geminina es una proteína que interacciona físicamente con Cdt1 (componente de los complejos pre-replicativos), inhibiendo su incorporación a los orígenes de replicación (Wohlschlegel *et al.*, 2000). La actividad de APC/C-Cdh1 mantiene niveles bajos de geminina en G1 lo que facilita la incorporación de Cdt1 a los pre-RCs y posibilita la posterior asociación del complejo MCM. En cuanto a Cdc6, otro de los componentes de los pre-RCs, pudiera parecer un contrasentido que sea sustrato de APC/C-Cdh1. Sin embargo, conviene mencionar que solo la forma no fosforilada es reconocida por Cdh1, mientras que la fosforilación mediada por Cdk2 (y tal vez por otras Cdk) protege a Cdc6 de su degradación por APC/C (Mailand y Diffley, 2005; Ayad, 2005). Por lo tanto, en un ciclo celular normal es muy probable que exista un periodo al final de la mitosis en el cual Cdc6 escape a la degradación para iniciar el licenciamiento de orígenes (Clijsters *et al.*, 2013).

También ligado a los orígenes de replicación, pero en esta ocasión a su activación, se ha identificado recientemente a ASK o Dbf4 (subunidad reguladora de la proteína Cdc7) como sustrato de APC/C-Cdh1 (Yamada *et al.*, 2013). En este caso, la actividad de Cdh1 en G1 promovería la degradación de Dbf4, contribuyendo a evitar el inicio de la replicación del DNA en esta fase del ciclo.

### 3.1.4. Inactivación de Cdh1

La entrada de la célula en fase S requiere la recuperación de los niveles de actividad Cdk y la inactivación del complejo APC/C-Cdh1, de manera que esta ubiquitina ligasa se encuentre inoperativa durante las fases S y G2 (Pines, 2011; Sivakumar y Gorbsky, 2015). Se han descrito varios mecanismos, posiblemente redundantes, que contribuyen a la inactivación de APC/C-Cdh1.

En primer lugar, la fosforilación de Cdh1 mediada por ciclina A-Cdk2 promueve su disociación de APC/C (Lukas *et al.*, 1999). En segundo lugar, se ha identificado un inhibidor, Emi1, (Rca1 en *Drosophila melanogaster* y Acm1 en *S. cerevisiae*) (Martínez *et al.*, 2006; Grosskortenhaus y Sprenger, 2002, Miller *et al.*, 2006) cuya expresión se induce por E2F, y que es capaz de interaccionar directamente con APC/C-Cdh1, impidiendo el reconocimiento de sustratos y bloqueando la elongación de la cadena de ubiquitina (Frye *et al.*, 2013). De hecho, la depleción de Emi1 en cultivos celulares bloquea la entrada en mitosis como consecuencia de la actividad remanente de Cdh1, y debido a la desestabilización de sustratos como ciclina A y geminina, desencadena procesos de rereplicación (Machida y Dutta, 2007). En tercer lugar, la abundancia de Cdh1 en el interior de la célula también está modulada. Así, la fosforilación de la proteína mediada tanto por ciclina A-Cdk1 como por Plk1 promueve su ubiquitinación por el complejo SCF- $\beta$ -Trcp y su posterior degradación por el proteasoma (Fukushima *et al.*, 2013). De esta forma se establece un mecanismo de inhibición mutua entre el complejo APC/C (que controla la estabilidad de Skp2) y SCF (que controla la estabilidad de Cdh1). También se ha descrito que Cdh1 es capaz de auto-ubiquitinarse y de promover su propia degradación proteolítica, lo que sin duda contribuye a inactivar el complejo APC/C-Cdh1 antes de entrar en fase S (Listovsky *et al.*, 2004).

Por otro lado, parece que la fosforilación de Cdh1 (mediada por Cdk1) promueve un cambio de localización sub-celular, siendo la forma no fosforilada mayoritariamente nuclear y la fosforilada mayoritariamente citoplasmática (Zhou *et al.*, 2003). Se cree que esta translocación también podría contribuir a evitar la reactivación del complejo APC/C-Cdh1 en las fases S y G2.

Por último, se ha propuesto un mecanismo complementario de inhibición de APC/C-Cdh1, por el cual, la E2 presente en el complejo APC/C (UBE2C ó UbcH10) sería, a su vez, sustrato de APC/C-Cdh1. Este proceso de auto-ubiquitinación sería sin embargo poco eficiente y estaría desfavorecido en presencia de sustratos canónicos del complejo. De este modo, la ubiquitinación y degradación de UBE2C solo ocurriría al final de la fase G1 (Rape y Kirschner, 2004).

### 3.2. APC/C-Cdh1 en diferenciación

El papel de Cdh1 no se limita a promover la poli-ubiquitinación de reguladores de ciclo en células proliferativas, sino que también parece ser necesario para impulsar la diferenciación de distintos tipos celulares y posiblemente también para mantener el estado de quiescencia asociado a la diferenciación.

### 3.2.1. Sistema nervioso

Los primeros indicios de la importancia de APC/C-Cdh1 en el sistema nervioso se obtuvieron al encontrar niveles particularmente elevados tanto de Cdh1 como de varias de las subunidades de APC/C en neuronas post-mitóticas (Gieffers *et al.*, 1999). Ahora sabemos que en estas células el complejo mantiene bajos los niveles de ciclina B1, y de este modo, evita que se produzca una inadecuada re-entrada en ciclo que podría inducir su muerte por apoptosis. Por lo tanto, APC/C-Cdh1 contribuye a mantener el estado diferenciado de este tipo celular y promueve su supervivencia (Almeida *et al.*, 2005).

APC/C-Cdh1 también participa en la regulación del crecimiento axonal, inhibiendo la expansión de los axones e influyendo sobre su patrón de ramificaciones. Y lo hace dirigiendo la degradación de SnoN y de Id2 (Stegmüller *et al.*, 2006; Lasorella *et al.*, 2006). Además, Cdh1 juega un papel importante en la regulación de la sinapsis, controlando la excitabilidad neuronal (Fu *et al.*, 2011).

Pero más allá de estas observaciones realizadas en sistemas celulares, estudios *in vivo* han confirmado la relevancia de Cdh1 tanto para el desarrollo como para la función cerebral. Así, en ratón, tanto la deficiencia sistémica en Cdh1 como la restringida a precursores neurales comprometen la neurogénesis cortical y originan un adelgazamiento de la corteza cerebral en embriones. En ambos casos se observa un exceso de proliferación de las células precursoras, aumento de los niveles de marcadores de daño en el DNA y muerte celular por apoptosis de dichas células (Delgado-Esteban *et al.*, 2013 ; Eguren *et al.*, 2013). Por otro lado, la inactivación en línea germinal de uno solo de los alelos de Cdh1 produce ratones aparentemente normales pero con problemas de aprendizaje y memoria (García-Higuera *et al.*, 2008 ; Li *et al.*, 2008). Estudios neurológicos más finos empleando modelos murinos de delección de Cdh1 restringida a determinadas regiones cerebrales, han demostrado alteraciones en la potenciación a largo plazo (LTP) dependiente de la amígdala y en la denominada memoria asociativa del miedo (Pick *et al.*, 2012, Pick *et al.*, 2013).

### 3.2.2. Gametogénesis

El complejo APC/C-Cdh1 es importante para mantener los oocitos detenidos en la profase I meiótica (Reis *et al.*, 2006), lo cual es a su vez imprescindible para preservar el *pool* de oocitos en el ovario. Tras la generación del modelo *knockout* condicional para Cdh1 se pudieron analizar oocitos deficientes en Cdh1 y se confirmó que también *in vivo* la actividad de dicho complejo

es esencial para controlar el momento y la eficacia de la primera división meiótica, y que su principal papel es reducir los niveles de ciclina B1 para evitar una activación prematura de Cdk1 (Holt *et al.*, 2011). También se comprobó que APC/C-Cdh1 controla igualmente el ensamblaje del huso meiótico, evitando de este modo que se produzcan errores en la segregación de cromosomas homólogos (Holt *et al.*, 2012; revisado en Homer, 2013). Pero si APC/C-Cdh1 es importante en ovogénesis, aun lo es más en espermatogénesis. Así se ha evidenciado en ratones macho con una delección de Cdh1 restringida a células germinales, que muestran una esterilidad completa debido a que las células precursoras de los espermatozoides son incapaces de progresar más allá del estadio de zigotene y mueren por apoptosis (Holt *et al.*, 2014).

### 3.2.3. Miogénesis

La formación del tejido muscular también requiere la actividad de APC/C-Cdh1 que, en este caso, promueve la diferenciación de los mioblastos para generar las fibras musculares definitivas. Utilizando un sistema celular de diferenciación de mioblastos *in vitro*, se ha comprobado que la degradación tanto de Skp2 como de Myf5 (un factor de transcripción de la familia MyoD) mediada por APC/C-Cdh1, es esencial para la diferenciación miogénica (Li *et al.*, 2007). La ubiquitinación del primero desencadena la acumulación de los inhibidores de ciclo p21 y p27, favoreciendo la salida del ciclo celular de los mioblastos. En cuanto a Myf5, si bien es crítico en los estadios iniciales de la miogénesis para la producción de progenitores musculares, parece que debe ser eliminado, en un proceso dependiente de APC/C-Cdh1, en la fase terminal de la diferenciación para facilitar la fusión miogénica y completar la diferenciación del tejido muscular (Li *et al.*, 2007). Faltaría comprobar si algo similar ocurre *in vivo* y si, en modelos animales, la ausencia de Cdh1 compromete la estructura y/o fisiología de las fibras musculares.

### 3.2.4. Diferenciación del cristalino

La diferenciación del cristalino se inicia por la inducción de la ruta de señalización de TGF- $\beta$ , que induce p15 y p21 (proteínas inhibidoras de las Cdk) y la subsiguiente salida de ciclo y entrada en un estado de quiescencia. En experimentos realizados con un sistema de diferenciación *in vitro* de células de epitelio de cristalino, se puso de manifiesto que el TGF- $\beta$  promueve la ubiquitinación de SnoN por APC/C-Cdh1 y su posterior degradación por el proteosoma. De este modo se libera la represión transcripcional que este factor ejerce, entre otros, sobre p15 y p21 (Wu *et al.*, 2007). Sin embargo, aun no se ha confirmado que *in vivo*, la actividad de APC/C-



Cdh1 sea necesaria para el desarrollo normal del cristalino.

### 3.3. APC/C-Cdh1 y el mantenimiento de la integridad cromosómica

Como ya se ha comentado, la actividad del complejo APC/C-Cdh1 no es imprescindible para completar el ciclo de división celular pero sí parece ser importante para determinar la duración de las distintas fases del ciclo y para preservar la integridad cromosómica. Así, en células deplecionadas o carentes de Cdh1 la fase G1 se acorta, es decir, se inicia prematuramente la fase S, y la fase G2 se alarga ligeramente. Además, se observa un mayor porcentaje de aberraciones mitóticas (puentes anafásicos, husos multipolares) y un aumento de células binucleadas, sugiriendo que la inactivación de APC/C-Cdh1 produce defectos en citoquinesis (García-Higuera *et al.*, 2008; Engelbert *et al.*, 2008; Sigl *et al.*, 2009; revisado en Wäsch *et al.*, 2010). Posiblemente, la estabilización de los sustratos mitóticos de APC/C-Cdh1, Aurora A y Plk1, podría explicar estas anomalías, puesto que su sobre-expresión da lugar a fenotipos similares (Meraldi *et al.*, 2002; Anand *et al.*, 2003). El análisis cromosómico de las células mutantes ha permitido, además, constatar una mayor incidencia de aberraciones tanto numéricas como estructurales, con un aumento de células aneuploides y mayor porcentaje de translocaciones (García-Higuera *et al.*, 2008). Esto indica que además de las segregaciones cromosómicas desiguales, se están produciendo en estas células roturas cromosómicas que favorecen las reorganizaciones.

Pero al margen de su función en un ciclo normal, se ha descrito que APC/C-Cdh1 es necesario para mantener el *checkpoint* de respuesta a daño en G2 (Sudo *et al.*, 2001; Basserman *et al.*, 2008). Según los autores del trabajo, en respuesta a agresiones genotóxicas el complejo APC/C-Cdh1 se reactiva de forma extemporánea en G2 e induce la degradación de Plk1. De este modo se estabiliza Wee1, la quinasa inhibitoria de Cdk1, con lo que se bloquea la entrada en mitosis. Por lo tanto, en ausencia de Cdh1, las células podrían iniciar mitosis con lesiones no reparadas, lo que sin duda podría favorecer la amplificación y/o estabilización de las lesiones en el genoma de la célula.

Por otro lado, la reciente identificación de una proteína directamente implicada en la reparación de roturas de doble cadena como sustrato de APC/C-Cdh1, sugiere que este complejo también podría estar modulando los procesos de reparación de DNA. Se trata de CtIP, la endonucleasa que lleva a cabo la resección de los extremos de las cadenas fragmentadas para facilitar su recombinación homóloga. Parece que APC/C-Cdh1 promovería su eliminación de los focos de reparación para evitar una resección excesiva (Lafranchi *et al.*, 2014).



### 3.4. APC/C-Cdh1 y supresión tumoral

En los últimos años se han ido acumulando evidencias cada vez más sólidas que apoyan la idea de que la inactivación de Cdh1 podría resultar tumorigénica. Así, por ejemplo, tanto el inhibidor de APC/C-Cdh1 (Emi1), como varios de sus sustratos (Skp2, Aurora A, Plk1, Nek2 y Geminina) se han encontrado sobre-expresados en tumores humanos, y se consideran potencialmente oncogénicos (Hsu *et al.*, 2002; Lehman *et al.*, 2007). Esta disposición alternante de moléculas oncogénicas y supresores tumorales encaja perfectamente con el esquema clásico de las vías tumorigénicas. Por otro lado, se han encontrado niveles bajos de Cdh1 tanto en líneas celulares derivadas de tumores (sólidos ó hematológicos) como en muestras de tumores de mama y colorrectales, y una búsqueda en la base de datos *Oncomine* reveló que Cdh1 podría estar sub-expresado en tumores de mama, próstata, ovario, y cerebro (Fujita *et al.*, 2008; Basserman *et al.*, 2008). Por último, en un estudio basado en un modelo de cáncer de mama murino inducido por xenotransplante de células tumorales, se comprobó que la depleción de Cdh1 en las células transplantadas aumentaba considerablemente el tamaño del tumor generado, mientras que su sobreexpresión lo reducía (Fujita *et al.*, 2008).

Con todo, los datos más definitivos sobre la implicación de Cdh1 en tumorigénesis los aportó el modelo de ratón deficiente en Cdh1. Los animales homocigotos para la delección morían en estadio embrionario debido a defectos placentarios. Sin embargo, los heterocigotos, que eran viables y fértiles, mostraron una mayor incidencia de tumores de origen epitelial. Además, no se detectó pérdida de heterocigosidad del alelo de Cdh1 en ninguno de los tumores, lo que sugiere que Cdh1 podría ser un nuevo supresor tumoral haploinsuficiente (García-Higuera *et al.*, 2008).

### 3.5. APC/C-Cdh1 y el control del metabolismo celular

El nexo de unión entre el metabolismo energético y APC/C-Cdh1 lo aportan dos enzimas que participan en la utilización de la glucosa y la glutamina, respectivamente, PFKFB3 (6-fosfofructo-2-quinasa/fructosa-2,6-bisfosfatasa-isoforma 3) y Glis1 (glutaminasa-1). Ambas han sido descritas como sustratos del complejo APC/C-Cdh1 (Colombo *et al.*, 2010; Herrero-Mendez *et al.*, 2009; revisado en Duan y Pagano, 2011). La actividad catalítica de PFKFB3 produce fructosa-2,6-bisfosfato, un potente activador alostérico del principal regulador de la glucólisis. Por lo tanto, PFKFB3 promueve la vía glicolítica de aprovechamiento de la glucosa para la obtención de energía. La ubiquitinación de esta enzima por APC/C-Cdh1 favorece la utilización de la glucosa a través de una vía alternativa, la de las pentosas fosfato, que genera

intermediarios metabólicos (por ejemplo para la síntesis *de novo* de nucleótidos) y poder reductor para, entre otras cosas, hacer frente al estrés oxidativo. Este mecanismo parece ser particularmente importante para promover la supervivencia neuronal (Herrero-Mendez *et al.*, 2009). En cuanto a GlS1, es la enzima que cataliza la primera reacción en la ruta metabólica de aprovechamiento de la glutamina, cuyo destino final será la producción de lactato y la obtención de energía. Por lo tanto, en presencia de APC/C-Cdh1 tanto la glucólisis como la glutaminólisis estarán restringidas. Por el contrario, la inactivación del complejo al final de G1 (en la transición G1/S) estimula ambas vías y permite que la célula alcance el estado energético necesario para su entrada en la fase replicativa, etapa del ciclo celular con extremo gasto de ATP. Por lo tanto, la regulación de APC/C-Cdh1 es crítica para acoplar la proliferación celular a la demanda energética requerida (Almeida *et al.*, 2010).

### 3.6. APC/C-Cdh1 y el control de la endorreplicación

Si bien Cdh1 es prescindible para el ciclo mitótico normal en todos los organismos analizados (desde levaduras hasta mamíferos), este cofactor sí parece requerirse para ciclos celulares alternativos en los cuales una célula duplica su genoma sin sufrir posteriormente división celular. Se trata de los ciclos endoreplicativos o endociclos que se producen de manera fisiológica en determinados organismos y tipos celulares a fin de aumentar el tamaño celular o la ploidía (revisado en Lee *et al.*, 2009). En ellos se alternan periodos de baja actividad Cdk, en los que se produce el ensamblaje de los complejos pre-replicativos, con periodos de actividad Cdk intermedia, que permite el disparo de los orígenes de replicación pero no la entrada en mitosis. Tanto en *Drosophila* como en mamíferos se ha comprobado que la actividad de APC/C-Cdh1 es esencial para mantener baja la actividad Cdk entre las sucesivas rondas de replicación (Zielke *et al.*, 2008).

En mamíferos, la salida del ciclo mitótico está inducida principalmente por la expresión de p21 y p57, regulándose la actividad de APC/C-Cdh1 entre fases por acción de Ciclina E-Cdk2 (Lee *et al.*, 2009). Esta regulación es particularmente importante para el desarrollo de la placenta donde las llamadas células trofoblásticas gigantes alcanzan niveles de ploidía de hasta 1000N. Así, una reducción en la magnitud de la endoreplicación afecta al funcionamiento de la placenta y compromete la viabilidad del embrión. Esto es exactamente lo que ocurre en ratón al delecionar las ciclinas E1 y E2 o Cdh1. En ambos casos la delección causa letalidad embrionaria por defectos placentarios y, en el caso de Cdh1, la letalidad se rescata al eliminar Cdh1 específicamente en tejido embrionario y no en placenta (Geng *et al.*, 2003; García-Higuera *et al.*, 2008).

## 4. Replicación del DNA en eucariotas

La duplicación del DNA genómico es un proceso semiconservativo que se requiere para la transmisión fidedigna de la información genética contenida en una célula a su progenie celular. Debido precisamente a la necesidad de copiar fielmente dicha información, la replicación del DNA es un proceso altamente regulado y en el que participan un gran número de proteínas, directa e indirectamente (Bell y Dutta, 2002; Masai *et al.*, 2010).

### 4.1. Etapas en la replicación

#### 4.1.1. Inicio de la replicación

Los orígenes de replicación determinan los sitios de inicio en el proceso de duplicación del DNA. La replicación en eucariotas se produce a partir de múltiples orígenes de replicación. En el caso de *S. cerevisiae* estos orígenes vienen determinados por secuencias de 11 o 17 pares de bases bastante conservadas (Palzkill y Newlon, 1988; Masai *et al.*, 2010), a las que se une el complejo de reconocimiento de orígenes (ORC, *Origin Recognition Complex*), complejo multiproteico constituido por seis subunidades (Orc1-6). Sin embargo, en eucariotas superiores, la unión de ORC no está condicionada por secuencias determinadas, aunque sí parece que hay una cierta afinidad por regiones ricas en A+T (Altman y Fanning, 2004) o próximas a islas CpG (Cadoret *et al.*, 2008).

Una vez que los orígenes de replicación han sido “etiquetados” como tales tras la unión de los ORCs, el siguiente paso es la formación de los complejos pre-replicativos (pre-RC, *pre-Replication Complex*), comúnmente conocida como licenciamiento de orígenes. Para ello, se requiere el acoplamiento secuencial sobre los orígenes de las proteínas Cdc6, Cdt1 y del complejo MCM (que constituye la helicasa replicativa y está formado por un anillo heterohexamérico de seis subunidades, MCM2-7). Para el ensamblaje del complejo MCM se requiere, además, la cooperación de otra proteína de su propia familia, MCM9, que colabora con Cdt1 en el enganche de la helicasa (Masai *et al.*, 2010; Méchali, 2010). Este proceso está limitado a un período temporal concreto (desde las últimas etapas de la mitosis y durante la fase G1) e inhibido durante la fase S para evitar fenómenos de re-replicación (Bell y Dutta, 2002; Masai *et al.*, 2010; Yekezare *et al.*, 2013). Varios son los mecanismos que contribuyen a que no se produzca en el momento equivocado.

Se ha comprobado, por ejemplo, que una elevada actividad Cdk es capaz de inhibir el

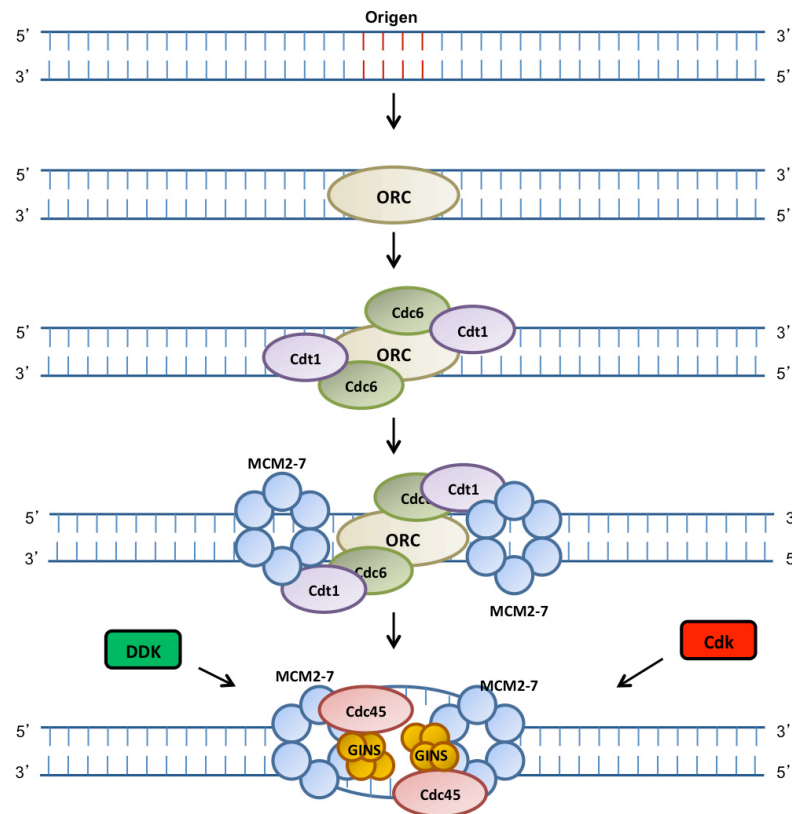
licenciamiento de orígenes, bien promoviendo la degradación de determinados componentes de los pre-RCs, como en el caso de Cdt1 (Sugimoto *et al.*, 2004), bien induciendo su translocación del núcleo hacia el citoplasma, como en el caso de Orc1 y Cdc6 (Saha *et al.*, 2006; Petersen *et al.*, 1999), o inhibiendo su unión a cromatina, como en el caso de Orc2 (Lee *et al.*, 2012). Un nivel adicional de regulación del licenciamiento lo constituye la proteína geminina, también mencionada con anterioridad, que interacciona físicamente con Cdt1, inhibiendo su incorporación a los complejos pre-RCs (Wohlschlegel *et al.*, 2000). Los niveles de geminina, cuya degradación es dependiente de APC/C-Cdh1, son bajos en G1 y máximos durante las fases S y G2, lo que contribuye a acotar temporalmente el licenciamiento. Complementariamente, la geminina también se comporta como un regulador positivo de Cdt1 en G2 y mitosis, ya que su interacción con Cdt1 inhibe la degradación proteasómica de este factor replicativo y posibilita su acumulación en mitosis (Ballabeni *et al.*, 2004; Ballabeni *et al.*, 2013).

Para activar al complejo MCM2-7 (incorporado al DNA como un doble anillo hexamérico) e iniciar la apertura de la doble hélice en ambas direcciones es necesaria la asociación de otras proteínas: Cdc45 y el complejo GINS (Aparicio *et al.*, 2006; Gambus *et al.*, 2006; Ilves *et al.*, 2010). Cdc45 interacciona con el complejo MCM2-7, constituyendo ambos la helicasa activa del replisoma. Mientras, el complejo GINS es vital para el mantenimiento de interacciones proteicas dentro de las horquillas de replicación. Conjuntamente conforman el denominado complejo CMG (Cdc45-MCM2-7-GINS). La unión de Cdc45 y GINS requiere de dos actividades quinasa: la de las Cdks, y la de la quinasa dependiente de Dbf4 (DDK o Dfb4-Cdc7 quinasa). Las Cdks, fundamentalmente el complejo ciclina E-Cdk2, se encargan de la fosforilación de pequeñas proteínas que se encuentran asociadas a los pre-RCs, Sld2 y Sld3 en *S. cerevisiae* (Tanaka *et al.*, 2007), y RecQL4 y treslina en vertebrados (Kumagai *et al.*, 2011; Symeonidou *et al.*, 2012). Por su parte, la quinasa Dfb4-Cdc7 fosforila mayoritariamente a algunas de las subunidades del complejo MCM, siendo la subunidad MCM2 su principal diana (Sheu y Stillman, 2006; Ramer *et al.*, 2013).

En este punto es importante destacar que tan solo el 10% de los orígenes que se licencian en mitosis y G1, se activará posteriormente durante una fase S normal (Masai *et al.*, 2010; Yekezare *et al.*, 2013; Rhind y Gilbert, 2013). Sin embargo, ese exceso de complejos pre-replicativos no supone un gasto inútil para la célula. En condiciones de estrés replicativo, en las que las horquillas de replicación se detengan o colapsen, la célula puede contar con esa reserva de orígenes durmientes para completar la duplicación del genoma (Ibarra *et al.*, 2007; Ge *et al.*, 2007; Alver *et al.*, 2014).

Otro rasgo interesante de la replicación es el hecho de que los orígenes no actúan como entes individuales, sino que se encuentran agrupados formando las denominadas factorías de

replicación. Aunque no está establecida con detalle la asociación existente entre los replisomas de una misma factoría, parece que varios orígenes activos podrían agruparse en un punto formando estructuras cromatínicas tipo lazo, promovidas por la acción de la cohesina. De este modo se favorecería la concentración de factores replicativos en una zona concreta (Guillou *et al.*, 2010; revisado en Masai *et al.*, 2010; Alabert y Groth, 2012; Rhind y Gilbert, 2013).



**Figura Introducción 4. Formación de complejos pre-replicative y activación de orígenes.** El primer paso en el licenciamiento de los orígenes de replicación es el reconocimiento del origen por parte del complejo hexamérico ORC. Posteriormente, se requiere la unión secuencial de las proteínas Cdc6 y Cdt1. A continuación, el reclutamiento de MCM2-7 sobre el origen en la forma de doble anillo heterohexamérico completará la formación del complejo pre-replicative. Seguidamente, la fosforilación mediada por DDK y Cdk sobre distintos componentes del replisoma facilitará la unión de Cdc45 y del complejo GINS, activando el origen e iniciando la replicación.

#### 4.1.2. Elongación. Progresión de la horquilla de replicación

Además de las proteínas ya mencionadas en el apartado anterior que forman parte del replisoma, se requiere la presencia de otros componentes para que se produzca el avance de las horquillas y la síntesis de la nueva cadena de DNA.

El factor de replicación C (RFC) promueve el reclutamiento de PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*), que actúa a modo de abrazadera, envolviendo al DNA y haciendo de soporte para la incorporación de otras moléculas necesarias en la síntesis, como las DNA polimerasas. En

eucariotas, la polimerasa encargada de la elongación de la cadena de DNA en la hebra continua es la polimerasa  $\epsilon$  y la responsable de la síntesis en la hebra discontinua es la polimerasa  $\delta$ . Ambas enzimas tienen capacidad correctora de errores, es decir, tienen actividad exonucleasa 3'-5' que les permite revertir la incorporación errónea de alguna base en la nueva cadena que están sintetizando (revisado en Bell y Dutta, 2002; Masai *et al.*, 2010).

### 4.1.3. Terminación

La terminación en eucariotas parece darse en regiones indefinidas de los cromosomas. El encuentro entre dos horquillas de replicación viajando en sentidos opuestos es lo que promueve la finalización en esa región concreta. Se cree que está amparada por la adopción de una topología determinada entre las cromátidas hermanas, que favorece la disociación de la maquinaria replicativa, y en la que intervienen enzimas como la DNA topoisomerasa II (Cuvier *et al.*, 2008; Fachinetti *et al.*, 2010).

## 4.2. Metabolismo de los dNTPs

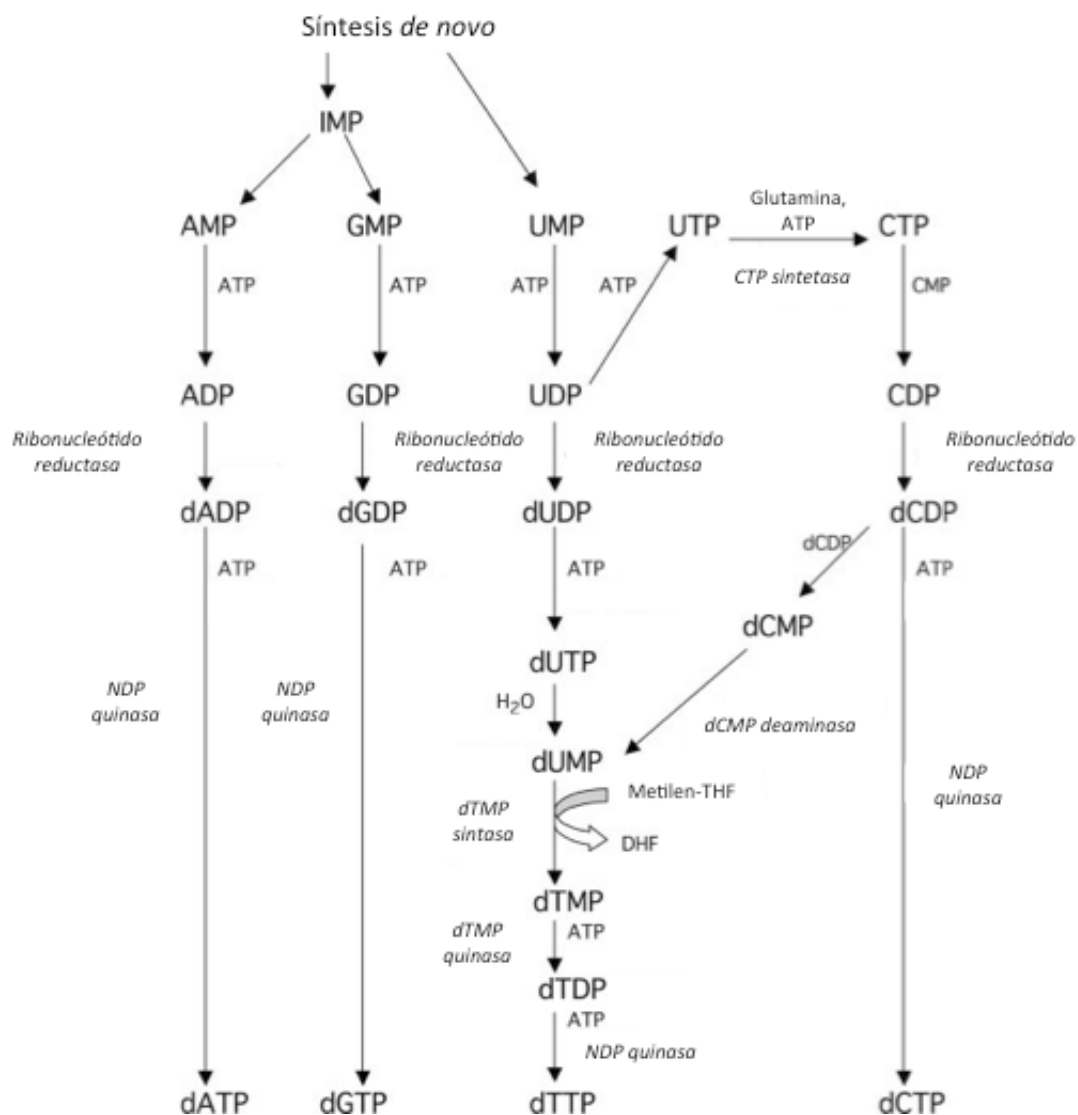
Los 2'-deoxirribonucleósidos-5'-trifosfato (abreviados como dNTPs) constituyen el sustrato necesario para la síntesis de la doble cadena de DNA durante la fase S. La biosíntesis de dNTPs es un proceso complejo en el que participan multitud de enzimas y que está modulado a lo largo del ciclo celular, con un marcado pico de producción en fase S (donde se alcanzan, en células de mamífero, hasta 20 veces los niveles de dNTPs con respecto a G1).

### 4.2.1. Biosíntesis *de novo*

En la síntesis *de novo*, la célula se sirve de dos sustratos primarios, como son la glucosa y la glutamina, para ir construyendo el esqueleto de los nucleótidos. La glucosa, transformada a través de la vía de las pentosas fosfato, da lugar a la ribosa; mientras que la glutamina aportará el nitrógeno necesario para las bases de los nucleótidos. Conviene diferenciar la síntesis *de novo* de los nucleótidos de purina, que requiere 11 reacciones enzimáticas para generar el precursor IMP (inosina monofosfato), de la síntesis de los de pirimidina, que requiere tan solo 6 reacciones para producir el intermediario UMP (uridina monofosfato). Sin embargo, la biosíntesis de los nucleótidos de timidina es un tanto particular, ya que implica la generación de

dUMP y su conversión a dTMP mediada por la Timidilato Sintasa (TS) (ver **Figura 5**) (Matthews, 2006; Aird y Zhang, 2015).

Ahora bien, el paso limitante en la biosíntesis *de novo* de todos los dNTPs es la reducción del grupo hidroxilo en la posición 2 de la ribosa, reacción catalizada por la ribonucleótido reductasa (RNR) a partir de ribonucleósidos difosfato (NDPs).



**Figura Introducción 5. Rutas en la biosíntesis *de novo* de los dNTPs.** Se muestran las principales reacciones en la síntesis *de novo* de los dNTPs en mamíferos, a partir de la obtención de IMP y UMP. En cursiva aparecen los nombres de las enzimas que catalizan las reacciones. Se aprecia como la síntesis del dTTP requiere la formación previa de dUMP, generado a partir de dUTP o bien a partir de dCMP. (Mathews, 2006).

### 4.2.2. Vía de rescate

La célula es capaz de aprovechar numerosos intermediarios generados a partir del catabolismo de los nucleótidos para sintetizar los dNTPs correspondientes. Sin entrar en demasiado detalle sobre las reacciones y enzimas de esta ruta, conviene destacar que esta vía de rescate parece cobrar especial relevancia en la replicación del DNA mitocondrial así como en la reparación del DNA en presencia de daño, siendo más eficiente el rescate de pirimidinas que el de purinas (Matthews, 2006; Chen *et al.*, 2010; Aird y Zhang, 2015).

### 4.2.3. Catabolismo

Además de las enzimas que participan en la vía de rescate y que catalizan reacciones de defosforilación o deaminación, entre otras, recientemente se ha descrito otra enzima que participa en la degradación de los dNTPs. Esta proteína es la SAMHD1, y posibilita la hidrólisis del residuo trifosfato, convirtiendo los dNTPs en deoxinucleósidos (Franzolin *et al.*, 2013). Se trata de una enzima de localización nuclear con actividad cíclica que alcanza su máximo rendimiento en la fase G1. De este modo, contribuye al control de los niveles de dNTPs disponibles y a evitar acumulaciones de los mismos en fases del ciclo en las que su presencia podría resultar perjudicial para la célula.

## 4.3. Control de los niveles de dNTPs a lo largo del ciclo celular

Como ya se ha comentado anteriormente, el nivel intracelular de dNTPs varía a lo largo del ciclo de división celular, siendo máximo durante la fase S y mínimo en G1. Esto se consigue, en buena medida, modulando los niveles de algunas de las enzimas que participan directamente en la biosíntesis de dNTPs y cuya degradación está mediada por APC/C-Cdh1.

### 4.3.1. Ribonucleótido reductasa (RNR)

La ribonucleótido reductasa (RNR) es la enzima que cataliza la reacción limitante en la síntesis de novo de los dNTPs. Permite la reducción de los cuatro ribonucleósidos difosfato a los correspondientes dNDPs: dADP, dGDP, dCDP y dUDP (Herrick y Sclavi, 2007; Torrents, 2014; Guarino *et al.*, 2014; Aye *et al.*, 2015). En eucariotas, las RNRs más abundantes son de la clase



La, con una estructura funcional constituida por dos subunidades grandes o  $\alpha$  (RRM1) y dos subunidades pequeñas o  $\beta$  (RRM2).

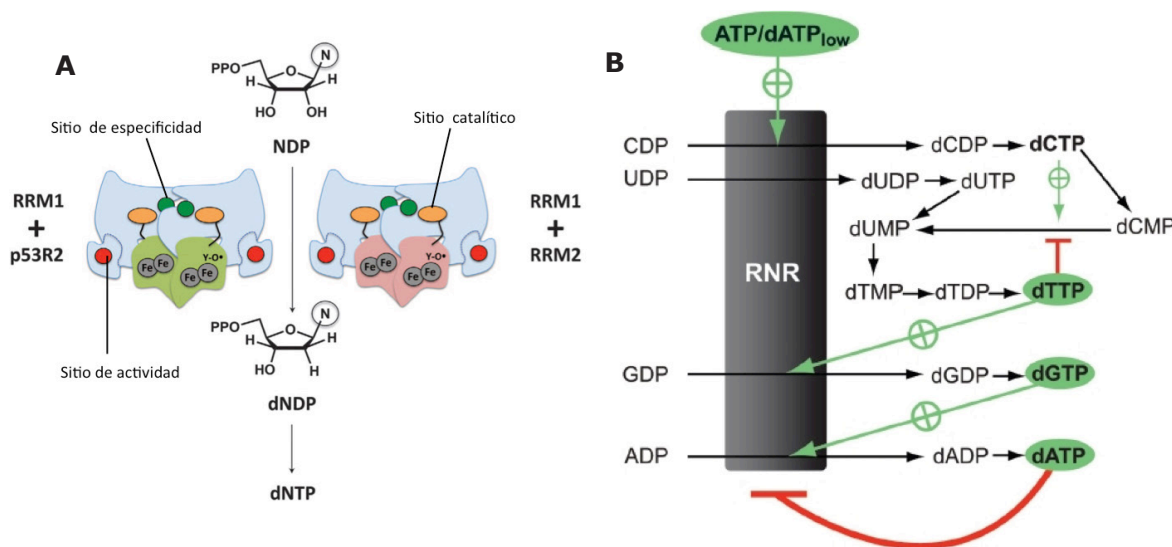
La subunidad RRM1 aporta el sitio catalítico de la enzima, y posee, además, dos sitios de regulación alostérica que permiten modular la actividad y especificidad de la RNR en función de la cantidad total y relativa de cada uno de los dNTPs. Así, el sitio de actividad es capaz de unir ATP y dATP, y cuando la relación ATP/dATP es favorable al primero, se estimula la actividad enzimática de la RNR. Por el contrario, cuando la concentración de dATP se incrementa con respecto a la de ATP, se inhibe la reducción de los cuatro ribonucleótidos. En cuanto al sitio de especificidad, admite la unión de dTTP, dGTP, y dATP y cada uno de ellos induce o inhibe la síntesis de otros dNTPs (Hofer *et al.*, 2012). Así, por ejemplo, la unión de dTTP limita la síntesis de dUDP y de dCDP y favorece la generación de dGDP (ver **Figura 6**). La expresión de RRM1 está controlada por E2F, pero debido a su larga vida media, sus niveles permanecen casi constantes, sin grandes fluctuaciones, a lo largo de todo el ciclo celular (Björklund *et al.*, 1990; Guarino *et al.*, 2014).

Por lo que respecta a la subunidad pequeña de la RNR, en mamíferos existen dos isoformas codificadas por genes independientes, *RRM2* y *p53R2*. La isoforma p53R2 se induce por p53 en presencia de daño y su actividad es fundamental para mantener unos niveles basales de dNTPs en G0 y G1 (necesarios para procesos fisiológicos de reparación del DNA), así como para aportar deoxirribonucleótidos para la replicación del DNA mitocondrial (Pontarin *et al.*, 2012; Yousefi *et al.*, 2014; Guarino *et al.*, 2014). En cuanto a la isoforma RRM2, su función está centrada en la replicación del DNA nuclear, aunque también participa en la reparación del DNA (Chabes y Thelander, 2000; Zhang *et al.*, 2009). Al igual que en el caso de la subunidad grande, la expresión de RRM2 también está inducida por E2F. Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre con RRM1, los niveles de RRM2 oscilan a lo largo de las distintas fases del ciclo celular siendo máximos en fase S y mínimos en G1 (Chabes *et al.*, 2004; Guarino *et al.*, 2014). Esto se debe a que RRM2 es degradada por el complejo SCF-ciclina F en G2 y por APC/C-Cdh1 a partir de anafase y durante G1 (Chabes *et al.*, 2003; D'Angiolella *et al.*, 2012).

La degradación de RRM2 en G2 requiere la fosforilación previa de ésta por Cdks para que sea reconocida por la ciclina F, una ciclina perteneciente a la familia de las proteínas con caja F (*F box protein*) que actúa como subunidad de reconocimiento de sustratos en el complejo SCF. La importancia de esta regulación cíclica de RRM2 quedó patente cuando, al expresar en células de mamífero una forma mutada de RRM2, no degradable por SCF-Ciclina F, se produjo un desequilibrio en la reserva general de dNTPs (con un aumento de dATP y dGTP) y un aumento significativo en la frecuencia de mutaciones espontáneas (D'Angiolella *et al.*, 2012). Por otra parte, se ha comprobado que esta degradación está inhibida en presencia de daño

en el DNA. Así, la activación de la respuesta a daño promueve una disminución de los niveles celulares de ciclina F (a través de un mecanismo dependiente de ATR) y, consecuentemente, una estabilización de RRM2 en G2, lo que estimula la síntesis de dNTPs necesarios para la reparación (D'Angiolella *et al.*, 2012).

En mitosis-G1, el encargado de dirigir la degradación de RRM2 es el complejo APC/C-Cdh1, que reconoce una secuencia tipo caja KEN presente en la región amino terminal de la proteína (Chabes *et al.*, 2003). De este modo se limita notablemente la síntesis de dNTPs durante la fase G1, manteniéndose únicamente una actividad residual de p53R2, que carece de secuencia KEN de reconocimiento y no es sustrato de APC/C-Cdh1.



**Figura Introducción 6. Ribonucleótido reductasa (RNR)** **A.** Estructura de la RNR, con los dos tipos de subunidades pequeñas que pueden conformar el complejo, la RRM2 y la p53R2, que poseen el núcleo biférrico necesario para la generación del radical tirosilo. No obstante, es en la subunidad mayor, la RRM1, donde se encuentra tanto el sitio catalítico como los sitios de regulación alostérica. **B.** Regulación alostérica de la RNR de mamíferos. Con flechas verdes se indican los reguladores positivos que estimulan la actividad global de la enzima o la específica sobre la reducción de alguno de los nucleótidos. Por contra, en rojo, se muestra la inhibición alostérica a la que se ve sometida la RNR (Aye *et al.*, 2014; Hofer *et al.*, 2012).

La necesidad de mantener bajo control la actividad de la RNR se ha demostrado también *in vivo*, en modelos animales. Así por ejemplo, en ratones transgénicos en los que se induce la sobreexpresión generalizada de RRM2, se ha detectado un mayor riesgo de mutagénesis acompañado por un incremento en la incidencia de tumores de pulmón (Xu *et al.*, 2008). Se piensa que la perturbación de las cantidades normales de dNTPs es la responsable de la aparición de mutaciones por incorporación errónea de bases, afectando a la fidelidad de la replicación y pudiendo derivar, eventualmente, en la transformación tumoral de la célula.

Por otra parte, RRM2 aparece sobreexpresada en distintos tipos de cáncer humano (Morikawa *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2013) y sus niveles patológicamente incrementados

se correlacionan con el grado de malignidad del tumor (Ma *et al.*, 2003; Aird *et al.*, 2013). Por todo ello, en los últimos tiempos se ha puesto especial hincapié en el desarrollo de estrategias terapéuticas encaminadas a la inhibición de la RNR (revisado en Aye *et al.*, 2015).

#### 4.3.2. Timidina quinasa (TK1) y timidilato quinasa (TMPK)

La enzima clave en la vía de rescate del dTTP es la timidina quinasa (TK1), que añade un grupo fosfato a la timidina transformándola en dTMP. Posteriormente, la timidilato quinasa (TMPK) y una nucleósido difosfato quinasa se encargan de la adición del segundo y tercer grupo fosfato, respectivamente. No hay que infravalorar la relevancia de esta vía, ya que, además de ser importante para los procesos de reparación de daño en el DNA, la sobreexpresión o delección de TK en células no dañadas produce alteraciones manifiestas en la concentración intracelular de dTTP, y por extensión, de los otros dNTPs (como consecuencia de la regulación alósterica ejercida sobre la RNR) (Chen *et al.*, 2010; Austin *et al.*, 2012).

Tanto TK1 como TMPK han sido descritas como sustratos del complejo APC/C-Cdh1 (Ke *et al.*, 2005). Por tanto, la ubiquitinación de estas enzimas favorecerá un ambiente celular de bajo dTTP al final de la mitosis y durante G1, hasta que la inactivación de Rb libere a E2F, y éste estimule la transcripción de *TK1* y *TMPK*. En este sentido, se ha comprobado que la expresión de mutantes de *TK1* y *TMPK* no degradables por APC/C-Cdh1 causa defectos de crecimiento en las células, desequilibrios en los niveles intracelulares de los distintos dNTPs (aumento notable de dTTP y dGTP y disminución de dCTP), y un sensible incremento en la tasa de mutación génica espontánea (Ke *et al.*, 2005).

#### 4.3.3. Importancia Fisiológica de la Regulación de los Niveles de dNTPs

La disponibilidad de dNTPs influye, en primer lugar, sobre la eficiencia de la replicación del DNA. A partir del momento en el que se inicia la fase S, la célula requiere de unos niveles de dNTPs en el núcleo suficientes para poder llevar a cabo la duplicación del genoma completo. Si se detecta un déficit en la concentración de los mismos, la célula responderá reduciendo la velocidad de progresión de las horquillas de replicación y, en casos extremos, deteniéndolas (Bester *et al.*, 2011). En estas condiciones se produce una mayor activación de orígenes durmientes adyacentes para intentar compensar la tasa global de síntesis y que la duración de la fase S se vea afectada lo menos posible (Anglana *et al.*, 2003; Bester *et al.*, 2011). Con todo,

con frecuencia la eficiencia de la síntesis del DNA se verá comprometida y se producirá estrés replicativo.

En los últimos años se han acumulado evidencias que sugieren que la inestabilidad genómica que aparece en los primeros estadios del desarrollo tumoral podría tener su origen en una limitada disponibilidad de dNTPs (Niida *et al.*, 2010; Bester *et al.*, 2011; Aird y Zhang, 2015). Así, la activación de determinados oncogenes produciría una reducción en la concentración de dNTPs (local o global) que a su vez generaría estrés replicativo e inestabilidad genómica, favoreciéndose de este modo la transformación celular maligna.

No obstante, es importante tener presente que tan negativo puede ser un defecto de dNTPs en el interior de la célula, como un exceso de los mismos. De hecho, en levaduras se ha comprobado que concentraciones anormalmente elevadas de dNTPs provocan un aumento de la tasa de mutagénesis, posiblemente debido a una disminución en la fidelidad de las DNA polimerasas y a una reducida eficiencia en la corrección de incorporaciones erróneas de bases (Davidson *et al.*, 2012). Además, como ya se ha discutido previamente, los desequilibrios entre las distintas especies de dNTPs también resultan perjudiciales para la célula, subrayando si cabe aún más la necesidad de ajustar de manera fina la homeostasis de estas moléculas (Chabosseau *et al.*, 2011; Austin *et al.*, 2012; Mannava *et al.*, 2012; D'Angiolella *et al.*, 2012).

El otro proceso celular para el cual los dNTPs también son indispensables es la reparación del DNA. De hecho, en levaduras se produce un incremento brusco en la concentración intracelular de dNTPs después de la generación de un daño sobre el DNA (Chabes *et al.*, 2003). En células de mamífero no se ha logrado cuantificar un aumento tan palpable (Hakansson *et al.*, 2006); sin embargo, los dNTPs también deben jugar su papel después de daño, ya que sí se ha observado un reclutamiento de RRM1 y RRM2 a focos de daño tras exposición a radiación ionizante o a microirradiación UVA (Niida *et al.*, 2010). Y aunque incluso tras la agresión genotóxica la fracción mayoritaria de la ribonucleótido reductasa conserva su localización citosólica, tras el insulto nocivo la subunidad grande (RRM1) forma un complejo con la histona acetiltransferasa Tip60 y es reclutada a los focos de daño. La acumulación de RRM1 y RRM2 en estos puntos conflictivos facilitaría así el aporte de nucleótidos necesarios para la reparación (Murr *et al.*, 2006; Niida *et al.*, 2010).

También en mamíferos y en situaciones de daño se ha constatado una inducción en la expresión de la subunidad pequeña de la ribonucleótido reductasa p53R2. Esta isoforma de la R2 se expresa mayoritariamente bajo el control de p53 en situaciones en las que se activa la vía de respuesta a daño. Se sabe que en ese contexto p53R2 se transloca al núcleo, donde quizás consiga aumentar la síntesis de dNTPs a nivel local (Pontarin *et al.*, 2012).

## 5. Estrés Replicativo

Se suele definir el estrés replicativo como la incapacidad de la célula para duplicar de manera eficiente su material genético, y se manifiesta como progresión lenta o incluso parada de las horquillas replicativas. Esto puede ocurrir por múltiples causas (que se discuten detalladamente en el siguiente apartado), pero las consecuencias son siempre negativas, ya que aumenta notablemente el riesgo de inestabilidad genómica.

### 5.1. Causas de estrés replicativo

Las causas que conducen a la generación de estrés replicativo son muy diversas. A continuación se describen algunas de las principales.

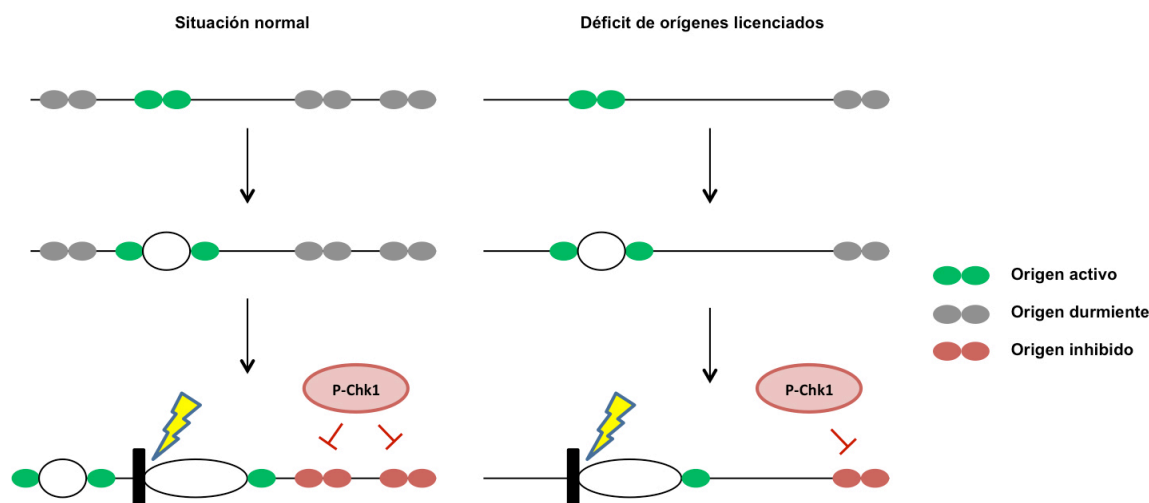
#### 5.1.1. Anomalías en el licenciamiento y disparo de orígenes de replicación

Tanto el disparo defectivo de orígenes, como la excesiva activación de los mismos conducen a situaciones de estrés replicativo. En el caso de la deficiencia en la utilización de orígenes lo que se piensa que ocurre es que cuanto menor es el número de orígenes activados, mayor es la distancia que tiene que recorrer una horquilla en su proceso de síntesis, lo que aumenta por simple estadística la probabilidad de que encuentre algún obstáculo (una lesión no reparada, por ejemplo) y se detenga (Hills y Diffley, 2014). Y si bien en condiciones normales esto se resolvería activando orígenes durmientes cercanos, la limitada disponibilidad de complejos pre-replicativos hace que también escaseen los orígenes durmientes, lo que necesariamente dificultará la replicación de la zona afectada (Ibarra *et al.*, 2008; Ge *et al.*, 2007). El escenario antagónico de hiper-activación de orígenes puede originar un agotamiento prematuro de precursores replicativos, principalmente dNTPs, provocando una ralentización de las horquillas replicativas que podría derivar en parada y colapso (Petermann *et al.*, 2010; Bester *et al.*, 2011).

#### 5.1.2. Obstáculos físicos para el avance del replisoma

Entre los obstáculos que pueden dificultar la progresión de la horquilla se encuentran las lesiones no reparadas en el DNA (bases dañadas, inter e intracruzamientos), causadas por agentes exógenos (sustancias genotóxicas) o endógenos (sub-productos del metabolismo celular), y la formación de complejos DNA-proteínas (Lambert y Carr, 2013; Zeman y Cimprich,

2014; Magdalou *et al.*, 2014).



**Figura Introducción 7. Importancia de los orígenes durmientes en situaciones de estrés replicativo.** En condiciones normales, el excesivo licenciamiento de orígenes permite que ante cualquier agresión que ocasione una parada en la horquilla de replicación los orígenes durmientes, que hubieran sido replicados de manera pasiva, se activen, completando la síntesis de la zona afectada. La respuesta mediada por el eje ATR-Chk1, consecuencia del *checkpoint* de fase S, inhibirá, a su vez, el disparo de los orígenes de replicación tardíos. Sin embargo, en situaciones en las que la carga de complejos pre-replicativos en cromatina es deficiente, la imposibilidad de activar orígenes durmientes adyacentes ante la presencia de un daño que bloquee la replicación puede desembocar en una duplicación incompleta del DNA con los consiguientes riesgos sobre la estabilidad genómica.

También la conformación adoptada por el DNA en determinadas regiones puede suponer un desafío para las helicasas y polimerasas replicativas. Así por ejemplo, tanto las estructuras conocidas como G-cuádruplex, típicas de secuencias con alto contenido en G-C, como las repeticiones de trinucleótidos que forman bucles, suponen una barrera física para la apertura de la horquilla y favorecen la aparición de roturas de doble cadena (McMurray, 2010; revisado en Zeman y Cimprich, 2014; Bochman *et al.*, 2012).

Por último, la incorporación errónea de ribonucleótidos (rNTPs) en la cadena sintetizada de DNA es otra de las posibles causas de estrés replicativo, ya que su presencia bloquea el avance de las polimerasas replicativas. En contra de lo que pudiera parecer, la introducción de rNTPs en la nueva molécula de DNA por parte de las polimerasas  $\epsilon$  y  $\delta$  es un fenómeno que se produce con moderada frecuencia. La responsable del reconocimiento y eliminación de los ribonucleótidos del DNA es la enzima RNasa H2 (cuya delección es letal en mamíferos), con la ayuda de otras endonucleasas. (Reijns *et al.*, 2012; Lazzaro *et al.*, 2012; revisado en Zeman y Cimprich, 2014).

### 5.1.3. Interferencias entre la maquinaria de transcripción y la de replicación

Aunque el programa transcripcional responsable de la expresión de los genes suele estar separado temporal y espacialmente de la replicación del DNA, en determinadas circunstancias es inevitable que se produzca una colisión entre ambas maquinarias habida cuenta de que ambas operan sobre el mismo molde de DNA. Esto puede ocurrir, por simple probabilidad, en zonas de alta densidad de orígenes activos (Jones *et al.*, 2013).

Por otro lado, la formación de segmentos híbridos ARN-DNA, que forman estructuras secundarias conocidas como bucle R o *R loop*, y para cuyo procesamiento es necesaria la participación de enzimas del tipo RNasaH, también pueden dificultar el avance de las horquillas (revisado en Aguilera y García-Muse, 2012; Magdalou *et al.*, 2014).

Existe, por último, una situación adicional en la cual la transcripción puede dificultar la replicación: la unión de las cadenas nacientes de ARN a los poros nucleares, que genera estrés topológico sobre el DNA. En este caso, la activación de la ruta de ATR permitiría aliviar el estrés topológico y replicar la zona afectada (Bermejo *et al.*, 2011; Bermejo *et al.*, 2012).

### 5.1.4. Disponibilidad limitada de factores replicativos

La replicación eficiente y fiel del genoma completo requiere de numerosos factores, algunos de ellos limitantes, y la escasez de los mismos puede ralentizar la progresión de las horquillas replicativas y, en último término, causar estrés replicativo. Así por ejemplo, se ha comprobado que cuando se eleva anormalmente el número de orígenes activos, pueden llegar a agotarse las reservas de RPA, con lo que los segmentos de DNA de cadena sencilla no pueden ser recubiertos y protegidos por esta proteína y las horquillas replicativas se vuelven más susceptibles a roturas (Toledo *et al.*, 2013). El proceso de replicación también requiere niveles elevados de histonas y un óptimo reciclaje y aporte de histonas en las zonas donde se desenrolla por un lado, y se compacta la nueva cadena de DNA por el otro, parece ser fundamental para que la dinámica de replicación no sufra alteraciones (Clemente-Ruiz y Prado, 2009; Mejlvang *et al.*, 2014). Pero sin duda los factores menos permisivos frente a alteraciones sutiles de sus niveles intracelulares son los dNTPs, cuya disponibilidad, como ya se ha mencionado, influye decisivamente sobre la eficiencia de la replicación. El ejemplo más claro de esta situación es la generada tras la activación de oncogenes, como Ras, c-Myc, o Ciclina E, que inducen una intensa respuesta proliferativa y un disparo masivo y simultáneo de orígenes que produce el agotamiento casi instantáneo de las reservas de dNTPs, lo que, a su vez, genera



estrés replicativo y daño genotóxico. De hecho, se ha comprobado que la suplementación del medio de cultivo de algunas líneas celulares tumorales con nucleósidos exógenos revierte el estrés replicativo y el fenotipo de inestabilidad genómica (Bester *et al.*, 2011; Jones *et al.*, 2013; Srinivasan *et al.*, 2013).

### 5.2. Respuesta celular frente al estrés replicativo

Cuando se produce la parada de la horquilla de replicación como consecuencia de alguna de las situaciones descritas anteriormente, se activa una respuesta celular encaminada a la estabilización de la horquilla y a la reanudación de la elongación de la cadena de DNA. El elemento clave en la generación de esta respuesta es la quinasa ATR (*ATM and Rad3 related*) (Ben-Yehoyada *et al.*, 2007; López-Contreras y Fernández-Capetillo, 2010; Jones y Petermann, 2012).

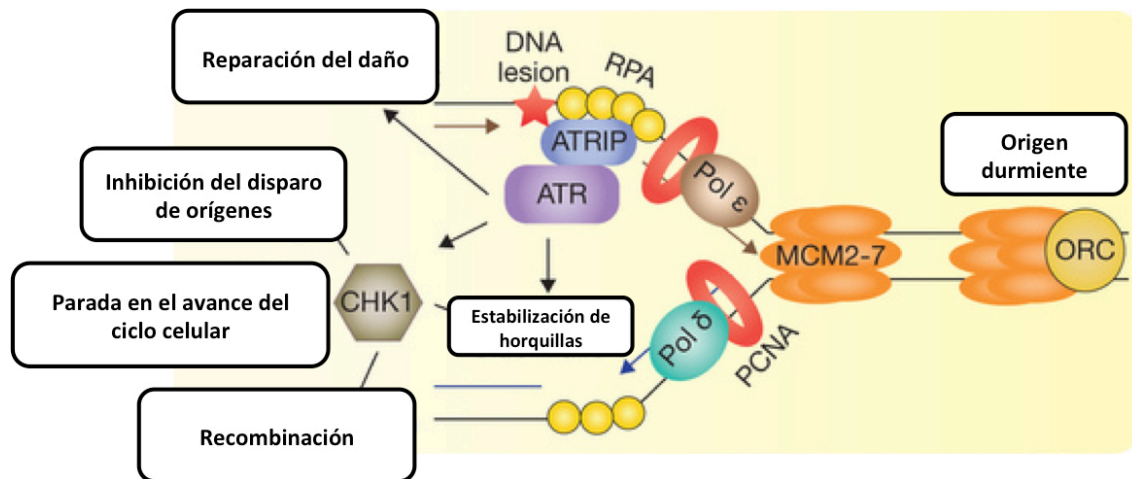
ATR pertenece a la familia de las quinasas relacionadas con la fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K) y se activa como consecuencia de la existencia de regiones de DNA de cadena sencilla (*ssDNA*) recubiertas por la proteína RPA (proteína de replicación A o *replication protein A*). Cuando se detiene una horquilla replicativa se produce un cierto desacoplamiento entre la actividad helicasa, que continúa separando las dos hebras del DNA, y la polimerasa, que permanece detenida, como consecuencia de lo cual se generan amplios tramos de DNA de cadena sencilla. Por eso, la respuesta celular frente al estrés replicativo está mediada fundamentalmente por ATR (Ben-Yehoyada *et al.*, 2007; Willis y Rhind, 2009; López-Contreras y Fernández-Capetillo, 2010; Jones y Petermann, 2012). La proteína RPA que se encuentra tapizando las zonas de *ssDNA* se encarga de focalizar la respuesta en las horquillas paradas (Zou y Elledge, 2003). Por una parte, es capaz de atraer la unión de ATRIP (proteína de interacción con ATR) que acudirá a las regiones de *ssDNA* en forma de complejo con el propio ATR (Cortez *et al.*, 2001). Y por otra parte, RPA posibilita la asociación de Rad17 (Zou *et al.*, 2003), factor que induce el ensamblaje del complejo trimérico tipo abrazadera 9-1-1 (Rad9-Rad1-Hus1). Este último favorece, a su vez, la unión de TopBP1 en las proximidades de ATRIP-ATR, lo que conduce a la activación máxima de la quinasa (Yang y Zou, 2006; Lee *et al.*, 2007). Una vez activada, ATR es capaz de fosforilar a múltiples sustratos, entre los que se encuentra Chk1, que se considera la quinasa efectora de la vía (Liu *et al.*, 2000).

En términos generales, la activación del eje ATR-Chk1 promueve las siguientes respuestas, esenciales para hacer frente al estrés replicativo : parar o ralentizar el ciclo celular, inhibir la activación de orígenes de replicación tardíos, estabilizar las horquillas detenidas y promover la



reparación del daño (si lo hubiera) y el reinicio de las horquillas replicativas.

Las dianas sobre las que actúa fosfo-Chk1 para inhibir el ciclo celular son múltiples. Por una parte fosforila a Wee1, activándola, y a Cdc25A, promoviendo su degradación, lo que garantiza un periodo de baja actividad Cdk e impide la progresión hacia mitosis (Jin *et al.*, 2003). Por otra parte cataliza la fosforilación de p53, cuya estabilización supone la estimulación de un programa transcripcional dirigido a la parada de ciclo (fundamentalmente gracias a la expresión del inhibidor de Cdk p21), y en casos extremos, a la muerte celular por apoptosis o a la senescencia celular (Shieh *et al.*, 2000; Taylor y Stark, 2001). En conjunto estas estrategias abren una ventana de oportunidad para resolver el problema que provocó el bloqueo de la horquilla replicativa, al tiempo que impiden que la célula avance hacia mitosis con parte de su contenido genético sin replicar.



**Figura Introducción 8. Activación de *checkpoint* de fase S.** En presencia de algún tipo de obstáculo o evento que impida la progresión de la horquilla de replicación se activa la respuesta mediada por ATR. El primer suceso en esta ruta es el revestimiento del DNA de cadena sencilla por la proteína RPA. Una vez reclutado ATR al foco de daño mediante la proteína de interacción ATRIP, se produce la amplificación de la señal gracias a la fosforilación de Chk1. Esta modificación dependiente de ATR desencadenará una serie de respuestas celulares encaminadas a la reanudación de la síntesis de la nueva molécula de DNA (Modificado de Zeman y Cimprich, 2014).

En relación a la inhibición del disparo de orígenes tardíos, aunque el mecanismo aún no está claramente establecido, parece que fosfo-Chk1 actuaría directamente sobre algunos de los componentes necesarios para la activación de orígenes, como el complejo treslina-TICRR, fosforilándolos e inhibiéndolos (Boos *et al.*, 2011; Guo *et al.*, 2015), y de manera indirecta, controlando la actividad Cdk necesaria para el disparo de orígenes (tal y como se ha descrito en el párrafo anterior) y limitando la iniciación dependiente de DDK (Costanzo *et al.*, 2003; Yekezare *et al.*, 2013).

El eje ATR-Chk1 también contribuye a estabilizar las horquillas bloqueadas inhibiendo la

disociación, en las mismas, de la maquinaria de replicación, pero aun no está claramente establecido cómo lo consigue (Arlt *et al.*, 2006).

En todo caso, incluso con la ruta de ATR funcional, una horquilla bloqueada durante un período prolongado de tiempo con frecuencia acabará colapsando y generando roturas de doble cadena. La aparición de estas roturas dispara la activación de ATM (*Ataxia Telangiectasia Mutated*, otra quinasa de la familia de la PI3K) mediada por el complejo MRN (Mre11-Rad50-Nbs1) y la consiguiente fosforilación de Chk2, la quinasa efectora de esta ruta. La función básica de ATM en situaciones de estrés replicativo se centra en iniciar la cascada de señalización necesaria para la reparación de las roturas de doble cadena, activando, por ejemplo, el proceso de recombinación homóloga y fosforilando proteínas indispensables para la resolución de determinados intermediarios, como las helicasas de la familia BLM (Ben-Yehoyada *et al.*, 2007; Willis y Rhind, 2009; López-Contreras y Fernández-Capetillo, 2010; Allen *et al.*, 2011; Jones y Petermann, 2012). La recombinación homóloga juega, además, un papel fundamental en el reinicio de las horquillas paradas o bloqueadas, y se ha comprobado que células portadoras de mutaciones en BRCA2, Rad51 o Mre11, muestran una replicación más lenta, posiblemente por su incapacidad para reiniciar horquillas que encuentran obstáculos endógenos (Costanzo *et al.*, 2001; Lomonosov *et al.*, 2003; revisado en Allen *et al.*, 2011 y en Jones y Petermann, 2012).

También la ruta de reparación de roturas de doble cadena conocida como unión de extremos no homólogos (NHEJ o *non-homologous end joining*) podría jugar un papel en el restablecimiento de las horquillas de replicación bloqueadas, bien en colaboración con las proteínas de recombinación homóloga, bien como una vía alternativa y redundante. Así, mutaciones en proteínas implicadas en esta ruta, como Ku80, producen defectos replicativos y un aumento de la sensibilidad a agentes que inducen estrés replicativo (Rampakakis *et al.*, 2008).

Por último, en algunos casos, las rutas de tolerancia al daño en el DNA (DDT) participan en la recuperación de horquillas bloqueadas, permitiendo esquivar el obstáculo que impide el avance de la horquilla. Es el caso de la vía de reparación por síntesis de translesión, que puede sortear alteraciones estructurales en la cadena de DNA en el momento de la polimerización, o bien rellenar a posteriori los huecos de ssDNA que se hayan podido generar al reiniciar la replicación más allá de la zona afectada por el bloqueo. Esta vía requiere la utilización de DNA polimerasas distintas a las replicativas, las polimerasas de translesión ( $\eta$ ,  $\kappa$ ,  $\iota$ ,  $\zeta$  y Rev1), así como de helicasas específicas (FANCI) (Jones y Petermann, 2012). Curiosamente, un estudio reciente ha puesto de manifiesto la existencia de una conexión entre ATR, Chk1, APC/C-Cdh1 y la ruta de tolerancia al daño. El trabajo demuestra que, tras la activación del *checkpoint* de fase S, Chk1 promueve la auto-ubiquitinación de Cdh1 (posiblemente a través de la fosforilación de algunas de las

subunidades de APC/C , incluyendo Cdh1) y su posterior degradación. De este modo se impide que la bajada de la actividad Cdk inducida por el propio *checkpoint* propicie la reactivación del complejo APC/C-Cdh1 y la degradación de proteínas necesarias para completar la replicación, entre ellas Dbf4, la subunidad reguladora de Cdc7. A su vez, la estabilización de Cdc7-Dbf4 promueve, a través de Rad18, la carga en cromatina de la polimerasa de translesión  $\eta$ , con lo que se facilita el baipás de la lesión que originó el bloqueo de la replicación (Yamada *et al.*, 2013).

### 5.3. Consecuencias del estrés replicativo

#### 5.3.1. Inestabilidad genómica

Como ya se ha comentado en el apartado anterior, el bloqueo de una horquilla de replicación con frecuencia genera roturas de doble cadena en el DNA. Estas roturas pueden producirse de forma pasiva en segmentos de DNA de cadena sencilla presentes en la propia horquilla o en zonas ya replicadas (con una mella en la hebra parental por ejemplo) por la propia fragilidad de la estructura. Alternativamente, pueden surgir como consecuencia de la acción de endonucleasas en un intento por deshacer estructuras aberrantes (tales como horquillas invertidas). Estas dobles roturas deben ser reparadas antes de que la célula inicie la mitosis ya que de lo contrario podrían ocasionar daños más graves como translocaciones cromosómicas o pérdida de material genético.

Al margen de las roturas, otro problema inherente al estrés replicativo es que puede impedir la replicación completa del genoma. Si la célula entra en mitosis con regiones parcialmente replicadas y/o con intermediarios de replicación sin resolver (producto de los procesos de reparación), la segregación cromosómica se verá comprometida, y aparecerán estructuras anormales como los llamados puentes anafásicos que mantienen físicamente unidas a las dos cromátidas hermanas. La ruptura de esos “puentes” al aumentar la tensión mecánica ejercida por el huso mitótico puede dar lugar a translocaciones cromosómicas o puede conducir a la pérdida de material genético en forma de micronúcleos (Zeman y Cimprich, 2014; Mazouzi *et al.*, 2014; Magdalou *et al.*, 2014; Lecona y Fernández-Capetillo, 2014). Otro tipo de defectos mitóticos, como son los husos mitóticos multipolares, originados por la presencia de centrosomas extra, parecen asociarse a situaciones de estrés replicativo de baja intensidad pero de tipo crónico (Wilhelm *et al.*, 2014).

Por otra parte, existen en el genoma zonas en las cuales las roturas y translocaciones ocurren

con mayor frecuencia en situaciones de estrés replicativo. Son los llamados sitios frágiles ó CFSs (*Common Fragile Sites*). Generalmente se localizan en regiones con un alto grado de compactación cromatínica, de replicación tardía y que contienen genes muy largos. Asimismo, se caracterizan por poseer una baja densidad de orígenes de replicación lo que implícitamente reduce la posibilidad de subsanar el bloqueo de una horquilla activando orígenes durmientes cercanos (Debatisse *et al.*, 2012). Recientemente se han identificado otras regiones frágiles asociadas a zonas transcripcionalmente muy activas, con predominancia de repeticiones C-p-G, y de transcripción temprana, por lo que se las conoce como sitios frágiles de replicación temprana o ERFS (*Early Replicating Fragile Sites*). En este caso la propensión a la inestabilidad podría estar relacionada con la probabilidad de conflictos entre la maquinaria de replicación y la de transcripción (Barlow *et al.*, 2013).

### 5.3.2. Tumorigénesis

La capacidad de los oncogenes para inducir estrés replicativo ha sido ampliamente documentada en los últimos años (al menos en líneas celulares). Los mecanismos por los cuales los estímulos oncogénicos producen defectos replicativos son variados y dependen del contexto celular y del oncogén, pero con frecuencia afectan al licenciamiento y disparo de orígenes y acaban agotando las reservas celulares de dNTPs. En todo caso, sea cual fuere el mecanismo, lo importante es que el estrés replicativo es la principal fuente de inestabilidad genómica en los primeros estadios del desarrollo tumoral y contribuye decisivamente a la transformación celular. Así, en las fases tempranas, las células que sufren estrés replicativo activarán la respuesta celular al daño en el DNA y si el daño replicativo es prolongado y no se puede reparar, esa misma respuesta dirigirá a las células hacia la muerte por apoptosis o hacia la senescencia (OIS o senescencia mediada por oncogenes) a través de p53. Sin embargo, si el estrés se dilata en el tiempo, aumentan las posibilidades de que, como consecuencia de la inestabilidad genómica, se introduzcan mutaciones que afecten a alguna de las proteínas de la respuesta a daño en el DNA, generalmente a p53. Si eso ocurre, la presión selectiva ejercida por el estrés replicativo hará el resto. Las células con una respuesta a daño defectiva escaparán al bloqueo en fase S y entrarán en mitosis transmitiendo sus mutaciones y reordenamientos genómicos a la descendencia. Y sucesivamente, estas células irán adquiriendo todas las características propias de las células tumorales (Lecona y Fernández-Capetillo, 2014; Hills y Diffley, 2014; Macheret y Halazonetis, 2015).

### 5.3.3. Envejecimiento

La acumulación de daño en el DNA a lo largo de la vida de un organismo está considerada como uno de los principales motores del proceso de envejecimiento, y numerosos estudios han demostrado que tejidos y células envejecidos tienen activada la respuesta a daño. De hecho, mutaciones en genes implicados en la reparación o señalización del daño con frecuencia causan síndromes de envejecimiento prematuro en humanos tales como el síndrome de Werner, la disqueratosis congénita o la ataxia telangiectasia, entre otros. Tradicionalmente se pensaba que la inestabilidad genómica que aparecía en organismos envejecidos era resultado del estrés oxidativo generado por las especies reactivas de oxígeno (ROS) procedentes de la mitocondria. Sin embargo, resultados contradictorios en ese sentido invitaron a considerar otras causas. Ahora sabemos que el estrés replicativo es una de las fuentes más importantes de inestabilidad genómica espontánea y contribuye decisivamente al envejecimiento celular y del organismo (Burhans y Weiberger, 2007).

El efecto del estrés replicativo sobre el envejecimiento se ha relacionado con la reducción de determinadas poblaciones de células madre y progenitoras y el consecuente deterioro de la homeostasis tisular. Parece que el daño asociado a la replicación podría ser suficiente para producir a lo largo del tiempo una disminución de las reservas de células madre, bien como consecuencia de la regeneración continuada de células más diferenciadas que mueren por exceso de daño, bien por la pérdida de funcionalidad de las células que conforman el nicho de las propias células madre (Ruzankina *et al.*, 2008; Flach *et al.*, 2014). Dos modelos murinos de deficiencia en ATR avalan estas afirmaciones. En el primero, la delección condicional de ATR en animales adultos provocó la pérdida de células proliferativas, la reducción severa de células madre en la médula ósea, piel e intestino, y la aparición de numerosos fenotipos asociados a envejecimiento (Ruzankina *et al.*, 2007). En el segundo modelo, se sustituyó el alelo silvestre de *Atr* por un alelo hipomórfico que reduce sensiblemente su nivel de expresión y que en humanos produce el conocido como síndrome de Seckel (la delección completa de *Atr* es incompatible con el desarrollo embrionario). Los ratones con niveles reducidos de ATR morían con menos de seis meses de vida presentando un estado caquéxico y rasgos claros de envejecimiento, y el estudio de las células madre hematopoyéticas reveló alteraciones cualitativas y cuantitativas similares a las encontradas en ratones silvestres envejecidos (Murga *et al.*, 2009).

### 5.3.4. Otras enfermedades

Además de las mutaciones ya descritas en ATR, se han asociado mutaciones que afectan a otras

tantas proteínas que participan en la estabilización y reparación de horquillas (algunas de ellas ya mencionadas brevemente) con distintas enfermedades humanas. Y aunque sus deficiencias se traducen en una heterogeneidad de fenotipos, todas ellas comparten la presencia de estrés replicativo como factor contribuyente al desarrollo de la patología. Por citar algunos ejemplos, a esta categoría pertenecen los síndromes de Werner y Bloom, debidos a mutaciones en las helicasas Wrn y Blm (Bernstein *et al.*, 2010; Chabosseau *et al.*, 2011), el síndrome Meier-Gorlin, en el que están afectados factores de los complejos pre-replicativos (Orc1-6, Cdt1 y Cdc6) (Hossain y Stillman, 2012), o los síndromes de Aicardi-Goutieres y de Schimke, originados por mutaciones en la RNasa H2 y en SMARCAL1, respectivamente (Pizzi *et al.*, 2015; Couch *et al.*, 2013).

A decorative background consisting of a grid of thick black lines. There are two vertical lines on the left side and two horizontal lines, one near the top and one near the bottom, intersecting to form a grid of rectangular sections.

# *Objetivos*





- 1.** Profundizar en el fenotipo de inestabilidad genómica asociado a la pérdida de Cdh1 en MEFs primarios.
- 2.** Analizar la dinámica de replicación del DNA en ausencia de Cdh1 y determinar si dicha ausencia genera estrés replicativo.
- 3.** Identificar el mecanismo molecular que vincula la pérdida de Cdh1 con los fenotipos detectados en MEFs primarios.
- 4.** Analizar el impacto de la actividad Cdk desregulada sobre los fenotipos celulares asociados a la deficiencia en Cdh1.





# *Material y Métodos*



## 1. Ratones

Los animales empleados para este trabajo se criaron y alojaron en el animalario OMG (de Organismos Modificados Genéticamente), perteneciente al Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Salamanca atendiendo a la normativa europea vigente. Los procedimientos realizados con los animales fueron aprobados por el Comité de Bioética de la Universidad de Salamanca.

El modelo *knockout* condicional de *Cdh1* se generó introduciendo secuencias LoxP a uno y otro lado del segmento que incluye los exones 2 y 3 del gen (Garcia-Higuera *et al.*, 2008). Dado que la deficiencia en línea germinal de *Cdh1* provoca letalidad embrionaria por defecto placentarios, para conseguir embriones deficientes en *Cdh1* viables, empleamos una cepa transgénica, Sox2-Cre, que expresa la recombinasa Cre en el embrión pero no en tejidos extra-embrionarios como la placenta. Estableciendo cruces entre hembras *Cdh1* (lox/lox) y machos *Cdh1* (+/-); Sox2-Cre obtuvimos embriones *Cdh1* ( $\Delta$ /-); Sox2-Cre (deficientes en *Cdh1*) y embriones *Cdh1* (+/lox) (control). Por otro lado, para generar embriones portadores del alelo condicional de *Cdh1* (alelo lox) establecimos cruces entre animales *Cdh1* (lox/lox) y *Cdh1* (-/lox).

El modelo *knockout* de *Skp2* procede del laboratorio del Dr. K. Nakayama de la Universidad de Fukuoka (Japón). En este caso, para obtener embriones control, deficientes en *Cdh1*, deficientes en *Skp2* o doblemente deficientes en *Cdh1* y *Skp2*, se establecieron cruces entre hembras *Cdh1* (lox/lox); *Skp2* (+/-) y machos *Cdh1* (+/-); *Skp2* (+/-); Sox2-Cre. Todos los animales se mantuvieron en fondo genético C57BL6.

## 2. Genotipado

El genotipado de los ratones y embriones se realizó por PCR a partir de muestras de DNA genómico. Para ello se cortó un pequeño fragmento del extremo de la cola de los animales adultos, o bien una pequeña porción de tejido de los embriones.

### 2.1. Extracción del DNA

Para extraer el DNA genómico de los tejidos escindidos, se realizó una digestión en una solución

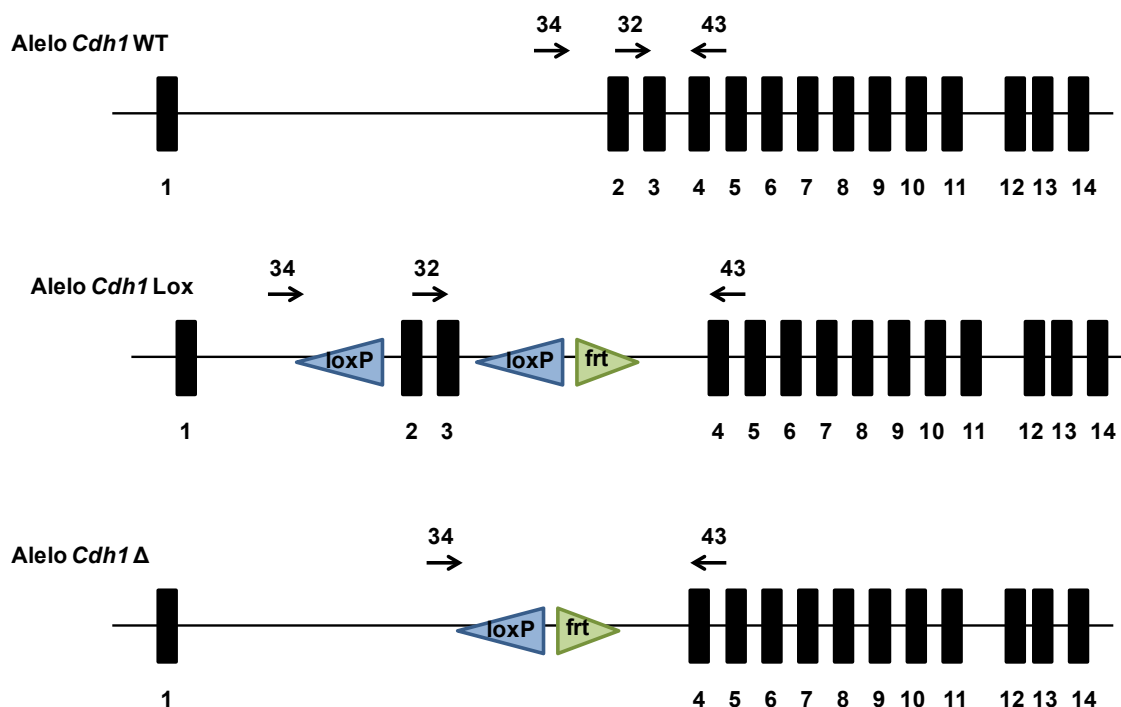
tamponada con proteinasa K a una concentración de 100 µg/mL. La composición del tampón utilizado para la digestión fue la siguiente: 50mM de KCl; 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>; 10mM de Tris-HCl pH 8,5; 0,01% de gelatina; 0,45% de Nonidet P-40; 0,45% de Tween 20. Tras 2-3 horas a 55°C con agitación constante, se inactivó la proteinasa K calentando la muestra a 95°C durante 15 minutos (min).

### 2.2. PCR (Reacción en cadena de la polimerasa)

Para la amplificación de las regiones de DNA de nuestro interés por PCR, se emplearon los oligonucleótidos indicados en la **Tabla 1** a una concentración final de 1 µM en presencia de dNTPs 200 µM, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM y betaína 1 M. Se aplicaron 35 ciclos de 30 segundos de desnaturalización a 95°C, 30 segundos de anillamiento a 58°C y 30-60 segundos de extensión a 72°C. Los segmentos amplificados se resolvieron posteriormente en geles de agarosa al 3% y se visualizaron tiñendo con Bromuro de Etidio o con *Midori Green*.

Nombre	Secuencia
<i>Cdh1-32-Fw</i>	AGCATGGTGACCGCTTCATCC
<i>Cdh1-34-Rv</i>	CCTGGTCCACAGAGGAAATTC
<i>Cdh1-43-Rv</i>	TGGCTGGGGGACTTCTCATTTTCC
<i>Cre-Fw</i>	CCGTTATTCAACTGCACC
<i>Cre-Rv</i>	CTGCATTACCGGTCGATGCAAC
<i>KN3 (Skp2)</i>	AGAGTGGAAGAACCCAGGCAGGAC
<i>KN4 (Skp2)</i>	CCCGTGGAGGGAAAAAGAGGGACG
<i>KN13 (Skp2)</i>	GCATCGCCTTCTATCGCCTTCTTG
<i>KN38 (Skp2)</i>	TTCCACCCCCACATCCAGTCATT

Tabla Métodos 1. Oligonucleótidos utilizados para el genotipado.



**Figura Métodos 1. Posición de anillamiento de los oligonucleótidos utilizados para *Cdh1*.** Esquema de la posición y direccionalidad de los cebadores usados para la amplificación de los alelos silvestre, Lox y Δ de *Cdh1*.

### 3. Cultivos celulares

#### 3.1. Establecimiento de cultivos primarios de MEFs (fibroblastos embrionarios murinos)

Para la obtención de cultivos primarios de MEFs se emplearon embriones de 13,5-14,5 días y se siguió el siguiente protocolo. Una vez extraídos los embriones de la hembra gestante, todos los pasos posteriores se realizaron en cabina de flujo laminar vertical, para evitar cualquier tipo de contaminación en el proceso. Se lavaron los embriones con PBS para eliminar los posibles restos de sangre, extrayéndolos posteriormente de sus respectivos sacos vitelinos. A continuación se desechó la cabeza así como los tejidos rojos (hígado, corazón, etc.) del embrión, triturando concienzudamente el resto del cuerpo con ayuda de una hojilla o bisturí. Seguidamente, se añadió 1 mL de tripsina (0,25% tripsina-EDTA, rojo fenol - *Gibco*) y se incubó durante unos 5-7 min para facilitar la disgregación celular. Después de comprobar que el tejido estaba perfectamente dissociado, se añadieron unos 10 mL de DMEM (*Sigma*), suplementado con 2 mM L-Glutamina (*Gibco*), 1% penicilina/estreptomicina (*Gibco*) y 10% FBS (*Gibco*), se pipeteó varias veces la solución celular resultante ayudando a la completa homogeneización

y se distribuyó uniformemente por una placa de cultivo de 150 mm diámetro, que fue introducida en un incubador a 37°C y con las condiciones de CO<sub>2</sub> (5%) y humedad constantes. A las 24 h se procedió a cambiar el medio de cultivo para eliminar las células muertas que flotaban en la placa, y a los 2-3 días, cuando el cultivo se aproximó a confluencia, las células se recogieron y se congelaron en varios viales, que se mantuvieron en tanque de nitrógeno líquido hasta volver a ser requeridas. Para el proceso de congelación, el crioprotector utilizado fue el DMSO (*Sigma*), a una concentración del 10% en FBS.

El medio de cultivo empleado rutinariamente para estas células fue DMEM con 4500 mg/L de glucosa (*Sigma*), suplementado con 2 mM L-Glutamina (*Gibco*), 1% penicilina/estreptomicina (*Gibco*) y 10% suero bovino fetal inactivado (FBS, *Gibco*). Los MEFs se utilizaron en todos los experimentos a pase 2-4.

### 3.2. Infecciones con adenovirus

Para lograr la escisión del alelo lox de *Cdh1* en los cultivos de MEFs se procedió a la infección de las células con adenovirus portadores de la Cre recombinasa (Ad-Cre). En paralelo, y como control, se infectaron los mismos cultivos con adenovirus vacíos (Ad-Cont) carentes de la recombinasa o con adenovirus portadores de GFP (Ad-GFP). Como control adicional, en algunos casos se realizó la infección en cultivos de MEFs silvestres (*Cdh1* (+/+)) con los mismos adenovirus (Ad-Cre y Ad-Cont). Todos los virus fueron adquiridos a través de *Gene Transfer Vector Core* (University of Iowa). El título del virus para cada una de las variantes utilizadas está recogido en la siguiente tabla.

Producto	Título (PFU/ $\mu$ L)
Ad-Cont ( <i>Ad5CMVempty</i> )	8*10 <sup>7</sup> virus/ $\mu$ L
Ad-Cre ( <i>Ad5CMVCre</i> )	6*10 <sup>7</sup> virus/ $\mu$ L
Ad-GFP ( <i>Ad5CMVeGFP</i> )	4*10 <sup>7</sup> virus/ $\mu$ L

Tabla Métodos 2. Adenovirus.

Después de probar distintas dosis de virus, valorando tanto la efectividad en la escisión del locus de *Cdh1* como la toxicidad en la respuesta producida por la infección, optamos por una



multiplicidad de infección (MOI) de 500 partículas virales por célula. Con esta dosis, logramos una disminución aproximada del 80% de los niveles de proteína por *Western* respecto al control, sin comprometer gravemente la viabilidad celular como consecuencia de la infección.

Las infecciones se llevaron a cabo sobre cultivos plaqueados el día anterior, a una confluencia aproximada del 70% y en un volumen pequeño de medio de cultivo (3 mL si son placas de 100 mm), para favorecer la entrada de los vectores al interior de las células. A las 8-10 horas se añadió un poco más de medio a cada placa (otros 3 mL) y a las 24 horas retiramos el medio con los adenovirus y añadimos medio fresco. Normalmente, en los experimentos de infección se recogieron muestras y se analizaron según lo requerido a dos tiempos distintos: un punto temprano correspondiente a 3-4 días después de la infección y un punto más tardío a día 7-8 del comienzo del ensayo.

### 3.3. Sincronización celular en G0

Para los experimentos que requirieron una sincronización de la población celular en fase G0 se partió generalmente de placas con una densidad de células aproximada del 80% con respecto a confluencia. Tras lavar los cultivos extensamente en 3 ocasiones con PBS, se añadió DMEM + 0,5% FBS, y se incubaron las células durante 72 horas. A partir de aquí, si el ensayo lo requería, se estimuló la reentrada en el ciclo celular por adición de DMEM + 20% FBS, recogiendo las distintas muestras a los tiempos establecidos.

### 3.4. Análisis de proliferación por incorporación de EdU

Para analizar la capacidad proliferativa y la eficiencia de la replicación de los MEFs en cultivo cuantificamos la incorporación de EdU (5-etinil-2'-deoxiuridina), un análogo de la timidina que se incorpora al DNA cuando se está realizando la síntesis de la nueva molécula en la fase S. Para ello, las células se incuban en presencia de EdU 10  $\mu$ M durante un periodo corto (1 ó 2 horas) y tras recogerlas y fijarlas se procede a la detección del análogo utilizando el kit comercial *Click-iT*<sup>®</sup> EdU de *Invitrogen*<sup>™</sup> que permite cuantificar las células positivas tanto por citometría de flujo como por microscopía de fluorescencia. La detección se basa en una reacción catalizada por cobre en la que se produce la unión covalente entre una azida acoplada a un fluorocromo y el EdU incorporado al DNA.

### 3.5. Tratamientos de las células en cultivo

Las condiciones empleadas para cada tratamiento se detallan a continuación:

**Mitomicina-C (MMC) (*Sigma*):** se trataron las células con diluciones seriadas (0-640 ng/mL) durante 5 días.

**Hidroxiurea (*Sigma*):** 4 días de tratamiento con diluciones seriadas de 0 a 200  $\mu$ M.

**PHA-767491 (*Sigma*):** la concentración utilizada fue de 20  $\mu$ M durante 4 h.

**dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP):** se preparó una mezcla de todos los nucleótidos a partir de viales individuales (*Sigma*) y se añadieron a 10  $\mu$ M durante 72 h (renovando el tratamiento a las 48h).

**Nucleósidos:** las condiciones de tratamiento fueron las mismas que para los dNTPs (en este caso se utilizaron la adenosina, citidina, guanosina, timidina y uridina, todos ellos de *Sigma*).

**Roscovitina (*Sigma*):** 10  $\mu$ M durante 12-24 h.

## 4. Ensayo de viabilidad celular

Tras los respectivos tratamientos de las células en cultivo con agentes genotóxicos que afectan a la replicación (MMC, HU), se determinó la viabilidad celular haciendo uso del kit comercial de *Promega CellTiter 96® AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay* que permite cuantificar las células viables en un cultivo mediante un ensayo colorimétrico basado en la metabolización de un compuesto derivado del tetrazolio, el MTS. Las células metabólicamente activas son capaces de reducir el MTS, dando lugar a un producto tipo formazán, que es soluble en el medio de cultivo, y fácilmente cuantificable por su absorbancia a 490 nm. El valor de la absorbancia para cada muestra será proporcional al número total de células viables en el pocillo. En los ensayos de sensibilidad a drogas se realizaron duplicados de cada concentración de droga, así como triplicados de cada determinación colorimétrica, descartando aquellos valores que se desviaban anormalmente del promedio. Una vez realizada la media aritmética de todos los valores para las distintas concentraciones, se representó la curva de viabilidad.

## 5. Ensayo de fibras de DNA (análisis de la dinámica de replicación)

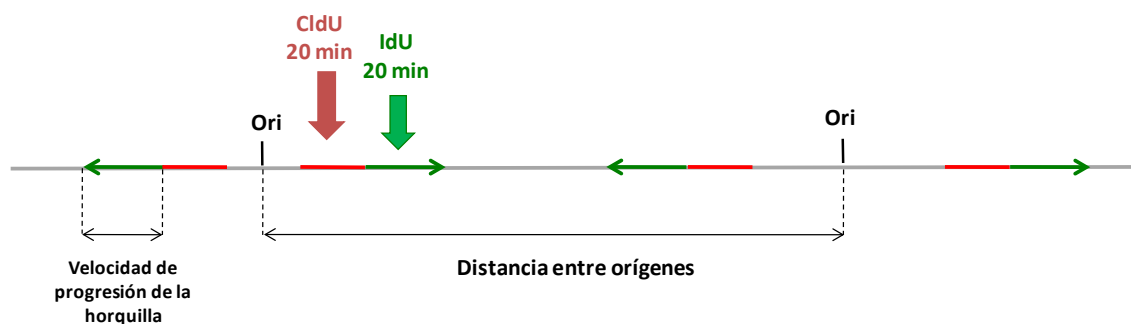
Para analizar de manera individualizada la progresión de las horquillas de replicación y la eficiencia en el disparo de orígenes, se utilizó esta técnica, aprendida en el laboratorio del Dr. Juan Méndez en el CNIO (Madrid) y trasladada posteriormente a nuestro laboratorio en Salamanca.

El protocolo comienza con el marcaje de los MEFs en cultivo (sin llegar a confluencia) con un análogo de la timidina, el CldU (*Sigma*) a 50  $\mu$ M durante 20 min. Transcurrido el tiempo de incubación a 37°C, se lavan las células tres veces con PBS atemperado, para añadir seguidamente el segundo análogo, el IdU (*Sigma*) a una concentración de 250  $\mu$ M. A los 20 min se tripsinizan las células, se lavan una vez con PBS y se resuspenden en PBS frío dejándolas a una concentración aproximada de  $2,5 \cdot 10^5$  células/mL. Aunque esta suspensión se puede mantener varios días a 4°C, es preferible continuar con el proceso y realizar la lisis celular. Para ello, se pipetea 2  $\mu$ L de la suspensión celular en el extremo de un portaobjetos limpiado previamente con EtOH 70% y se añaden 10  $\mu$ L de la solución de lisis (0,5 % SDS, 200 mM Tris pH 7,4, 50 mM EDTA), preparada y precalentada previamente a 30°C. Se incuba el portaobjetos con la suspensión celular a temperatura ambiente (TA) y con humedad en una pequeña caja durante 6 min, al cabo de los cuales se inclina el recipiente unos 10-15° (esto se consigue apoyando el extremo de la caja sobre algún soporte estable, como una gradilla de *ependorf*) para permitir que la gota se deslice lentamente, por efecto de la gravedad, sobre la superficie del portaobjetos, lo que posibilita la extensión de las fibras de DNA. Cuando la gota llega al final de la superficie de vidrio, se deja secar el portaobjetos y se realiza seguidamente la fijación con una solución fría (-20°C) de metanol : ácido acético glacial 3:1.

El siguiente paso es la desnaturalización del DNA a TA utilizando una solución de HCl 2,5 M durante 30 min. Se lava bien en 3 ocasiones asegurándonos de haber eliminado todo el HCl y a partir de ahí se inicia el marcaje con los anticuerpos para la detección de los dos análogos. Para ello se incuban los portaobjetos con la solución de bloqueo durante 1 h (1% BSA, 0,1% Tritón X-100 en PBS) y posteriormente, una hora más, con los anticuerpos primarios específicos para CldU, IdU, y para el DNA de cadena sencilla (para poder verificar así la continuidad de las fibras). (Nota: la información detallada de todos los anticuerpos utilizados en la tesis está recogida en la **Tabla Métodos 3**). Después de 3 lavados con PBS, se incuba con la mezcla de anticuerpos secundarios igualmente a TA, durante 30 min. Finalmente, tras otros tres lavados con PBS, se dejan secar los portaobjetos y se montan las preparaciones con *ProLong® Gold* (*Life Technologies*), colocando un cubreobjetos sobre la muestra. Cuando la preparación está seca se examina en el microscopio de fluorescencia, y se capturan numerosas imágenes para poder conseguir un volumen de mediciones aceptable en el posterior análisis.

### 5.1. Medidas de la velocidad de progresión de la horquilla y la distancia entre orígenes

Para determinar dos de los parámetros fundamentales en la dinámica de replicación, esto es, la velocidad de avance de las horquillas y la distancia entre orígenes de replicación adyacentes, hicimos uso del *ImageJ*, programa informático de análisis de imágenes. Como se observa en la **Figura Métodos 2**, la velocidad de síntesis de la nueva cadena de DNA viene determinada por la longitud de los segmentos de IdU, el segundo análogo añadido. Con el *ImageJ* se obtuvo el valor en  $\mu\text{m}$  de cada uno de los fragmentos de DNA medidos. A partir de ahí, por una simple correlación sabiendo que 1  $\mu\text{m}$  equivale a 2,59 kb (kilobases) (Jackson y Pombo, 1998) y dividiendo la longitud del segmento por el tiempo de marcaje (20 min), se calculó la velocidad de progresión de cada horquilla. En el caso de la distancia entre orígenes (IOD o *inter origin distance*), se requirió la identificación previa de dos orígenes de replicación adyacentes en la misma hebra de DNA. Una vez localizados, se procedió a la medición y a la posterior conversión en kb aplicando la relación entre  $\mu\text{m}$  y kb antes mencionada.



**Figura Métodos 2. Ensayo de fibras de DNA.** Esquema representativo de los parámetros replicativos que se pueden determinar a partir de los experimentos de fibras de DNA. Se muestran dos orígenes de replicación adyacentes (Ori) en la misma cadena sencilla de DNA y los fragmentos marcados tras la adición de los dos análogos de timidina.

En cada experimento individual de fibras se realizaron al menos 250 mediciones para determinar la velocidad de progresión de la horquilla y un mínimo de 30 mediciones para calcular la distancia entre orígenes.

### 5.2. Análisis de la dinámica de replicación en eritroblastos de hígado fetal

Al igual que el protocolo anterior, este procedimiento también fue facilitado por el laboratorio del Dr. Juan Méndez.

Los pasos iniciales en el aislamiento de los hígados fetales fueron idénticos a los de la

preparación de MEFs. Se utilizaron embriones de 14,5 días (E14,5), pero en este caso extrajimos el hígado y preparamos una suspensión celular hepática en frío con RPMI + 2% FBS pipeteando varias veces enérgicamente. Diluimos 1  $\mu$ L de la suspensión anterior en 500  $\mu$ L de RPMI + 2% FBS y centrifugamos durante 5 min a 1500 rpm a 4°C. Eliminamos el sobrenadante y resuspendimos el pellet en unos 300  $\mu$ L de RPMI + 2% FBS, añadiendo el CldU a una concentración de 50  $\mu$ M e incubando a 37°C durante 20 min. Se centrifugó y se lavó 3 veces con PBS y seguidamente se incubó con el segundo análogo, el IdU 250  $\mu$ M, también 20 min a 37°C. Después de otros tres lavados con PBS se resuspendió la muestra con tampón de lisis ACK (*Gibco*) a 4°C y se incubó durante 1 min para producir la lisis de los eritrocitos maduros y purificar de alguna forma la preparación. Se detuvo la reacción con RPMI + 2% FBS, se centrifugó y se lavó una vez más con PBS. A partir de este punto del protocolo se continuó con el procedimiento estándar de preparación y tinción de las fibras de DNA, detallado previamente.

## **6. Estimación de la duración de la fase S (experimentos de doble pulso con CldU e IdU)**

Para estimar la extensión de la fase replicativa en los MEFs se realizaron ensayos de pulso-caza-pulso con los dos análogos de la timidina (CldU e IdU) siguiendo el protocolo descrito por Yokochi y Gilbert (2007). Las células se sembraron y crecieron sobre cristales circulares en placas de 12 pocillos y el marcaje con el primer análogo, CldU, se realizó en las mismas condiciones que para los experimentos de fibras de DNA, pero durante 30 min. Seguidamente, las células se incubaron con medio de cultivo normal durante el tiempo que se hubiera predeterminado como tiempo de caza, y finalmente tras 30 min de incubación en presencia de IdU, se lavaron los pocillos con PBS, y se efectuó la fijación de las células con MeOH 100% a TA durante 5 min. Tras realizar dos lavados con PBS, los cristales se incubaron con HCl 1,5 N durante 30 min a TA para posteriormente proceder al bloqueo con 5% BSA en PBS-Tween (0,5% Tween-20) durante 20 min a TA, y seguidamente al marcaje con los anticuerpos correspondientes. Primero, se incubaron las muestras con el anti-CldU 1 h y su correspondiente anticuerpo secundario también 1 h a TA diluidos en la solución de bloqueo. Tras tres lavados de 5 min cada uno con PBS-T se continuó con la incubación con el anti-IdU durante 1 h. Transcurrido este tiempo y después de lavar 3 veces con PBS-T se realizó un lavado adicional durante 15 min con un tampón de alta concentración salina (0,5% Tween-20; 0,4 M NaCl y 0,2% NP40 en PBS). Seguidamente se incubaron los cristales con el anticuerpo secundario

correspondiente durante 1 h a TA. Finalmente, se tiñeron las muestras con una solución de DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol), antes de realizar los lavados finales con PBS-T y de montar las preparaciones con *ProLong® Gold* sobre portaobjetos. La visualización de las muestras y captura de imágenes se efectuó en microscopio de fluorescencia con los filtros apropiados.

### 7. Cuantificación de los niveles intracelulares de dNTPs

Para la determinación de los niveles intracelulares de nucleótidos se contó con la colaboración del grupo del Dr. Andrei Chabes, en la Universidad de Umeå (Suecia). No obstante, la extracción de los dNTPs se realizó en nuestro laboratorio, enviando posteriormente las muestras congeladas en hielo seco por correo internacional.

Para cada genotipo analizado, se partió de 3 o 4 placas de cultivo de 150x20 mm al 80% de confluencia. En primer lugar, se lavó dos veces cada placa con una solución fría y estéril de NaCl 9 g/L. Tras aspirar de manera eficiente todo el líquido, la extracción se realizó sobre hielo añadiendo 250 µL de una solución fría de 15% TCA y 30 mM MgCl<sub>2</sub> a la primera placa. Las células se despegaron de la placa haciendo uso de un raspador de plástico, y la suspensión resultante se pipeteó sobre la siguiente placa, repitiendo el proceso de raspado. Así hasta llegar a la última placa, quedando un volumen resultante final de unos 700-800 µL, los cuales se transfirieron a un tubo y se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido. Las muestras se conservaron en ultracongeladores a -80°C hasta el día del envío a Suecia.

Aunque inicialmente en el laboratorio del Dr. Chabes la cuantificación de los dNTPs se intentó realizar por HPLC como se describe en (Buckland *et al.*, 2014), finalmente optaron por efectuar la medición con una técnica más sensible puesta a punto recientemente, utilizando un equipo de LC-MS (cromatografía de líquidos con espectrómetro de masas). Este método, que aumenta notablemente la precisión de los resultados, combina el poder de separación del HPLC con la capacidad de detección selectiva e identificación molecular del espectrómetro.

Paralelamente a la cuantificación intracelular de los dNTPs se llevó a cabo también la medición de los rNTPs (ribonucleótidos) en cada muestra, para poder normalizar los valores obtenidos para los dNTPs.

## 8. Técnicas de proteínas

### 8.1 Preparación de extractos proteicos a partir de células en cultivo

Para la obtención de los extractos proteicos se recogieron los MEFs por tripsinización, lavando el pellet celular con PBS frío y conservando la muestra a  $-80^{\circ}\text{C}$  o alternativamente procesándola en el momento. Los precipitados celulares fueron resuspendidos en un volumen de 50-100  $\mu\text{L}$  de un tampón de lisis Tris (Tris 10 mM pH 7,5; EDTA 2 mM), suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasa. La lisis celular se completó con la adición de un volumen equivalente de un tampón 2x (125 mM Tris HCl pH 6,8; 4% SDS; 20% glicerol), agitando la muestra en un vórtex e hirviendo inmediatamente durante 15 min a  $99^{\circ}\text{C}$ . Cumplido este tiempo, se centrifugó a  $4^{\circ}\text{C}$  durante otros 15 min a 13000 rpm, transfiriendo el sobrenadante a un tubo limpio. El extracto resultante se congeló o bien se continuó con la valoración proteica para determinar la concentración de proteínas.

### 8.2 Cuantificación de la concentración de proteínas a partir del extracto total

Para la valoración proteica se utilizó el kit comercial *Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo)*, basado en la reducción del catión  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Cu}^{+}$  por parte de las proteínas en medio básico. El catión resultante forma un producto quelado con dos moléculas de BCA, dando lugar a un producto soluble que tiñe la solución acuosa de un color púrpura, cuya absorbancia a una longitud de onda de 562 nm puede ser determinada en un espectrofotómetro. La absorbancia de cada muestra es proporcional a la cantidad de proteína presente en la misma. Finalmente, para poder determinar la concentración proteica de los extractos iniciales, por cada conjunto de muestras valoradas se utilizó una recta patrón construida a partir de concentraciones conocidas de albúmina sérica bovina (BSA).

### 8.3. Inmunodetección por *Western Blot*

#### a. Preparación de muestras

Rutinariamente, y si la concentración proteica de los extractos lo permitía, se prepararon las muestras con 50  $\mu\text{g}$  de proteína total, completando el volumen de carga (hasta 40  $\mu\text{L}$ ) con tampón de carga (62,5 mM Tris HCl pH 6,8; 2% SDS; 10% glicerol; 100 mM DTT; y azul de bromofenol). Antes de cargarlas en el gel, las muestras se hirvieron durante 5 min a  $95^{\circ}\text{C}$  y se centrifugaron.

### b. Electroforesis de proteínas en SDS-PAGE

La separación unidimensional de proteínas en función de su tamaño molecular se realizó por la técnica de *SDS-PAGE* (*Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*). En función del tamaño de las proteínas a identificar se utilizaron geles de poliacrilamida (*ProtoGel*® 30% acrilamida-bisacrilamida, *National Diagnostics*) de distinto porcentaje. De manera ordinaria, se prepararon geles del 10% de poliacrilamida. No obstante, cuando quisimos visualizar proteínas de bajo peso molecular (en torno a 15 kDa) optamos por geles del 14% y en el caso de proteínas de alto peso molecular (del orden de los 100 kDa) elegimos geles del 8%. La preparación de los geles de poliacrilamida se desarrolló en una solución tamponada con Tris y SDS, utilizando persulfato amónico y TEMED (BioRad) como agentes polimerizantes para la gelificación.

Para la electroforesis propiamente dicha se hizo uso del sistema Mini-Protean II de *BioRad*, utilizando como tampón de carrera una solución compuesta por Tris 25 mM, glicina 0,2 M y SDS 0,1%. Por otra parte, para guiarnos en la identificación de las proteínas cargamos un marcador de peso molecular (*Precision Plus Protein*™ de Biorad). Los geles se mantuvieron corriendo a TA y a voltaje constante (100-120 V) hasta que desapareció el frente de electroforesis (azul de bromofenol), o hasta que la migración del marcador de peso molecular permitiera intuir una resolución óptima de las proteínas de los extractos celulares.

### c. Transferencia de proteínas

Los geles con las proteínas separadas por electroforesis fueron transferidos a membranas de nitrocelulosa (*BioRad*, tamaño de poro 0,2  $\mu\text{M}$  o 0,45  $\mu\text{M}$ ), sirviéndonos para ello del sistema Mini Trans-Blot de *BioRad*. La transferencia se realizó con una solución tamponada (Tris 25 mM, glicina 0,19 M y MeOH 20%) en cámara fría, a voltaje constante (100 V) y durante 135 min. Finalizada la transferencia, se tiñeron las membranas con el colorante Rojo *Ponceau* (*BioRad*) para verificar la correcta migración de las proteínas del gel a la nitrocelulosa y hacer una evaluación inicial de la igualdad de carga en los distintos carriles. Seguidamente, se bloquearon las membranas con 5% leche (*Sveltesse*, *Nestlé*) en TBS-T (0,05% Tween-20 en TBS) durante 1 h a TA y se lavaron posteriormente un par de veces con TBS antes de incubarlas con los anticuerpos primarios.



#### d. Inmunodetección de proteínas

La detección de las proteínas de interés se llevó a cabo mediante la incubación en cámara fría (4°C) durante toda la noche en un *Navigator™* con los anticuerpos primarios correspondientes. La dilución de los anticuerpos se realizó generalmente en TBS con 5% BSA y 0,05% azida. Tras los tres lavados pertinentes de 10 min cada uno con TBS-T, se procedió a la incubación con el anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa diluido en 5% leche TBS-T. Finalmente, después de una hora de incubación y de lavar nuevamente en 3 ocasiones con TBS-T, las membranas se revelaron con los reactivos de quimioluminiscencia *ECL* (*Perkin Elmer® Plus-ECL* o *Perkin Elmer® ECL Ultra* en función de la intensidad de la señal) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la detección de la quimioluminiscencia se emplearon las películas autorradiográficas *Amersham Hyperfilm ECL*, exponiendo las mismas a diferentes tiempos para lograr distintos grados de saturación de las bandas proteicas. La cuantificación de las proteínas tras el revelado se realizó con el programa de análisis de imágenes *ImageJ*.

Con el objeto de poder reutilizar las mismas membranas de nitrocelulosa para la incubación con varios anticuerpos de la misma especie, en algunos casos se procedió al *stripping* de las membranas para eliminar los anticuerpos pegados a su superficie. Para ello, se realizó un procedimiento de lavado en condiciones básicas, agitando la membrana durante 10 min con NaOH 0,5 M. Después de cada *stripping* fue necesario lavar bien la membrana con agua destilada y bloquear de nuevo con leche antes de incubar con el nuevo anticuerpo primario.

#### 8.4. Inmunodetección de proteínas en cromatina. Fraccionamientos subcelulares

Para la detección exclusiva de proteínas en la fracción cromatínica se siguió el protocolo descrito en (Méndez y Stillman, 2000). Para ello, se partió de placas de cultivo con al menos  $2 \times 10^6$  MEFs recogidos por tripsinización. Se resuspendió el precipitado celular a una concentración de  $1-4 \times 10^7$  células/mL en una solución tamponada A (10 mM Hepes pH 7,9; 10 mM KCl; 1,5 mM  $MgCl_2$ ; 0,34 M sucrosa; 10% glicerol) a la que se añadió 1 mM de DTT e inhibidores de proteasas (aprotinina 5 µg/mL, leupeptina 5 µg/mL, pepstatina A 0,5 µg/mL y PMSF 0,1 mM). A la suspensión resultante se le añadió tritón X-100 al 0,1% y se incubó en hielo durante 5 min (todas las incubaciones y centrifugaciones posteriores se realizaron también a 4°C). Al cabo de los 5 min se centrifugó a 3500 rpm durante 4 min, guardando tanto el sobrenadante (S1), como el precipitado (P1), que contenía los núcleos intactos. Se lavó el P1 con la misma solución tamponada A más DTT e inhibidores de proteasas y se centrifugó de nuevo en las mismas condiciones que antes. Posteriormente se resuspendió el P1 en una solución no salina (3 mM EDTA, 0,2 mM EGTA) de nuevo con DTT e inhibidores de proteasas

y se incubó durante 30 min, agitando ocasionalmente. Tras la media hora se centrifugaron las muestras a 4000 rpm durante 4 min, conservando el sobrenadante, que contenía las proteínas solubles nucleares. En cuanto al precipitado, se lavó con el tampón no salino, se centrifugó igual que previamente y el nuevo precipitado se resuspendió en un tampón de carga Laemmli 1x, prestando atención a que no se formara un agregado viscoso que dificultara la posterior carga en los geles. Volviendo con el S1, se centrifugó durante 15 min a 13400 rpm, desechando el precipitado y manteniendo el sobrenadante, que constituía la fracción citosólica.

(Nota: en los ensayos de fraccionamiento se partió del mismo número de células para todas las muestras del experimento, realizando todas las resuspensiones en el mismo volumen, con el objetivo de minimizar las variaciones en las cantidades de proteína cargadas en los geles).

## 9. Inmunofluorescencia celular

Para los ensayos de inmunofluorescencia, los MEFs se cultivaron sobre cristales circulares. En algunos casos, especialmente si existía el riesgo de que las células se despegaran durante el procesamiento posterior, se trataron los cristales previamente con poli-D-lisina para mejorar la adhesión celular a la superficie del cristal. En el momento de recoger los MEFs, los cristales se lavaron con PBS, y las células se fijaron con paraformaldehído (PF) al 4% durante 15 min a TA. En el caso concreto de los ensayos de inmunofluorescencia para detectar focos de RPA, previa a la fijación con PF hubo que realizar una pre-extracción en frío de las proteínas solubles durante 3-5 min para eliminar el exceso de fondo y facilitar la visualización de la fracción proteica unida a cromatina. La solución tamponada que se empleó para la pre-extracción constaba de Tris 20 mM pH 8, NaCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 3 mM, 0,5% tritón y sacarosa 300 mM.

Tras la fijación y los lavados correspondientes con PBS, se procedió a la permeabilización celular con 0,1% tritón en PBS durante 10 min. Después de lavar nuevamente con PBS y de bloquear durante 30-60 min con 2,5% BSA y 10% suero de cabra en PBS, se incubaron los cristales con los correspondientes anticuerpos primarios en la solución de bloqueo durante 2 h. Por su parte, el marcaje con los anticuerpos secundarios conjugados a fluorocromos se realizó durante 1 h también en la solución de bloqueo. Para la visualización de los núcleos se empleó una dilución de DAPI. Para finalizar el proceso, se montaron los cristales sobre un portaobjetos con *ProLong® Gold*.

En el caso de que se hubieran marcado los MEFs en cultivo con EdU, antes de realizar las incubaciones con los anticuerpos pertinentes fue necesario efectuar la reacción para la detección del análogo de timidina de siguiendo las instrucciones del proveedor (*Invitrogen*).

Anticuerpo	Procedencia	Especie	Dilución	Aplicación
anti-53BP1	Novus Biologicals NB100-304	Conejo (policlonal)	1/5000	IF
anti-BrdU (clon BU1/75)	Abcam ab6326	Rata (monoclonal)	1/100	IF (Ensayo de fibras)
anti-BrdU	BD 347580	Ratón (monoclonal)	1/100	IF (Ensayo de fibras)
anti-Cdc6 (clon DCS-180)	Upstate #05-550	Ratón (monoclonal IgG1)	1/250	WB
anti-Cdt1 (clon EPR4729)	Abcam ab109421	Conejo (monoclonal)	1/250	WB
anti-Ciclina A	Millipore	Conejo (policlonal)	1/100	WB
anti-Ciclina B1 (clon V152)	Abcam ab72	Ratón (monoclonal)	1/1000	WB
anti-Ciclina D1 (clon SP4)	Thermo Scientific #RM-9104	Conejo (monoclonal)	1/200	WB
anti-Ciclina E1 (HE12)	Cell Signaling #4129	Ratón (monoclonal IgG1)	1/1000	WB
anti-Chk1 (G-4)	Santa Cruz sc-8408	Ratón (monoclonal)	1/100	WB
anti-Fosfo-Chk1 (Ser345) (133D3)	Cell Signaling #2348	Conejo (monoclonal)	1/250	WB
anti-Cdh1 (clon AR38)		Ratón	1/10	WB
anti-Geminina FL-209	Santa Cruz sc-13015	Conejo (policlonal)	1/400	WB
anti-fosfo-H3 (Ser10)	Millipore #06-570	Ratón (policlonal)	1/500	IF
anti-H2AX	Abcam ChIP grade (ab11175)	Conejo (policlonal)	1/2000	WB
anti-fosfo-H2AX (Ser139) (20E3)	Cell Signaling #9718	Conejo (monoclonal)	1/500	WB
anti-fosfo-H2AX (Ser139) (JBW301)	Millipore #05-636	Ratón (monoclonal IgG1)	1/2000	IF

## Material y Métodos

<b>anti-fosfo-H2AX (Ser139)- Alexa Fluor® 647</b>	BD 560447	Ratón (monoclonal IgG1)	1/10	C
<b>anti-MCM2 (2B3)</b>	Abcam ab119921	Ratón (monoclonal)	1/1000	WB
<b>anti-fosfo-MCM2 (Ser53) (EP4120)</b>	Abcam ab109	Conejo (monoclonal)	1/5000	WB
<b>anti-MCM3</b>	Juan Méndez lab.	Conejo (policlonal)	1/2000	WB
<b>anti-MCM4</b>	Juan Méndez lab.	Conejo (policlonal)	1/2000	WB
<b>anti-p16 (M-156)</b>	Santa Cruz sc-1207	Conejo (policlonal)	1/2000	WB
<b>anti-p21 (F-5)</b>	Santa Cruz sc-6246	Ratón (monoclonal)	1/250	WB
<b>anti-p27 (clon 57)</b>	BD 610242	Ratón (monoclonal IgG1)	1/1000	WB
<b>anti-p53 (1C12)</b>	Cell Signaling #2524	Ratón (monoclonal IgG1)	1/250	WB
<b>anti-fosfo-p53 (Ser15)</b>	Cell Signaling #9284	Conejo (policlonal)	1/250	WB
<b>anti-Rad51 (H-92)</b>	Santa Cruz sc-8349	Conejo (policlonal)	1/100	WB
<b>anti-RPA32 (4E4)</b>	Cell Signaling #2208	Rata (monoclonal IgG1)	1/100	IF, WB
<b>anti-RPA32 (9H8)</b>	Abcam ab2175	Ratón (monoclonal)	1/100	WB
<b>anti-fosfo-RPA32 (Ser4/Ser8)</b>	Bethyl A300-245A-2	Conejo (policlonal)	1/250	WB
<b>anti-RRM2</b>	Abcam ab191800	Conejo (policlonal)	1/1000	WB
<b>anti-fosfo-(Ser) sustrato de Cdks (P-S<sup>2</sup>-100)</b>	Cell Signaling #9477	Conejo (monoclonal)	1/1000	WB
<b>anti-Skp2 (L70)</b>	Cell Signaling #4313	Conejo (policlonal)	1/500	WB
<b>anti-ssDNA</b>	Millipore MAB3034	Ratón (monoclonal)	1/100	IF (Ensayo de fibras)
<b>anti-TK1</b>	Abcam ab59271	Conejo (policlonal)	1/500	WB
<b>anti-DTYMK (TMPK) C-terminal</b>	Abcam ab71756	Conejo (policlonal)	1/250	WB

**Tabla Métodos 3. Anticuerpos primarios** (C=citometría, IF=inmunofluorescencia, WB=Western Blot).

Anticuerpo	Procedencia	Dilución	Aplicación
anti-ratón/conejo (inmunoglobulinas) HRP	Dako	1/10000	WB
anti-ratón/conejo IgG Cy3	Jackson	1/1000	IF
anti-ratón/rata/conejo IgG A-488	Molecular Probes	1/1000	IF
anti-rata IgG A-594	Molecular Probes A11007	1/300	IF (Ensayo de fibras)
anti-ratón IgG1 A-488	Molecular Probes A21121	1/300	IF (Ensayo de fibras)
anti-ratón IgG2a A-350	Molecular Probes A21130	1/300	IF (Ensayo de fibras)

**Tabla Métodos 4. Anticuerpos secundarios** (IF=inmunofluorescencia, WB=*Western Blot*).

## 10. Ensayo del cometa

Los experimentos del cometa para la detección de roturas en el DNA fueron realizados por mi compañero de laboratorio y estudiante de doctorado Rubén Rodríguez González, aprovechando su experiencia previa en esta técnica y su excelente disposición a la hora de colaborar con el trabajo. Básicamente, este método permite cuantificar el daño por la migración electroforética de los fragmentos nucleares de DNA rotos, después de haber realizado una lisis celular y desnaturalización. La estructura resultante en caso de daño después de la electroforesis, similar a la de un cometa, es la responsable de que esta técnica reciba este apelativo.

Se partió de una suspensión celular de MEFs de concentración  $1,5 \times 10^6$  células/mL, recogidos previamente por tripsinización de placas en cultivo. Se mezclaron 30  $\mu$ L de esta suspensión con 65  $\mu$ L de agarosa de bajo punto de fusión (LMA) al 0,5% previamente calentada en microondas y se pipetearon sobre un portaobjetos con una primera capa de agarosa ya solidificada. Esta primera capa había sido preparada anteriormente con agarosa de punto de fusión normal (NMA) al 0,5%, calentada igualmente en microondas y dejándola solidificar. Al añadir la segunda capa con las células se colocó un cubreobjetos sobre la preparación y se mantuvo a 4°C y en oscuridad hasta que solidificó. Transcurrido el tiempo necesario, se preparó una tercera

capa también de agarosa de bajo punto de fusión (LMA) al 0,5% y se añadió sobre las otras dos capas después de haber retirado cuidadosamente el cubreobjetos, dejando solidificar de la misma forma que la segunda lámina.

Posteriormente se realizó la lisis celular, sumergiendo los portaobjetos en 200 mL de solución de lisis fría y preparada en el instante, dejando a 4°C durante 1 h. La solución de lisis se compuso de 89% de tampón de lisis pH10 (NaCl 2,5 M; Na<sub>2</sub>EDTA 100 mM; Tris 10 mM; NaOH 0,25 M), 10% DMSO y 1% tritón X-100.

Finalizada la lisis se colocaron los portaobjetos en una cubeta de electroforesis, sumergiéndolos en una solución tamponada desnaturalizante y fría, constituida por Na<sub>2</sub>EDTA 1 mM y NaOH 300 mM pH 12,6. Pasados 20 min se realizó la electroforesis a 4°C durante otros 20 min, en oscuridad y a 25 V y 300 mA. Seguidamente se neutralizaron los portaobjetos lavándolos con 2 mL de tampón de neutralización (Tris 0,4 M, pH 7,5), y después de secarlos se fijaron con etanol durante 3 min a TA. Por último, la tinción del DNA se realizó con bromuro de etidio a 0,5 µg/mL justo antes de observar las preparaciones en el microscopio de fluorescencia.

Para el análisis de las imágenes procedentes de los ensayos del cometa se utilizó la herramienta de análisis OpenComet, considerando al menos 50 células por condición en cada experimento. A partir del procesamiento de las imágenes con este programa se obtuvo el valor del momento de la cola del cometa, parámetro comúnmente aceptado como unidad de referencia para medir el grado de daño en el DNA en este tipo de ensayos y que representa el producto de la longitud de la cola del cometa por la fracción del DNA total presente en la cola.

## **11. Microscopía**

### **11.1 Microscopía de contraste de fases**

Para la observación de los MEFs que se mantenían en crecimiento en cultivo se utilizó un microscopio de contraste de fases con objetivos 20x y 40x.

### **11.2. Microscopía de fluorescencia**

Para la visualización y captura de imágenes de los experimentos de inmunofluorescencia, los ensayos de fibras de DNA y los ensayos de cometa se usó el microscopio de fluorescencia

vertical Nikon Eclipse 90i, equipado con una cámara digital *Hamamatsu* modelo ORCA-ER y dotado con objetivos para preparaciones en seco y con aceite de distinta magnitud. Particularmente, el objetivo mayoritariamente utilizado en el presente trabajo fue un objetivo de inmersión *Plan Apo-Chromat VC 60x*, aunque de manera ocasional también se hizo uso del objetivo de 100x. Debido a la utilización de distintos fluorocromos en los ensayos (DAPI, *Alexa-488*, *Alexa-594*, etc.), fue necesario el empleo de diferentes filtros para producir la excitación a longitudes de onda particulares. En cuanto a la captura de imágenes, el programa informático utilizado fue el *MetaMorph®* (*Molecular Devices*) y el posterior procesamiento y análisis de las fotografías tomadas se realizó a través del *ImageJ*.

## 12. Citometría de flujo

Los ensayos por citometría de flujo permitieron el análisis del ciclo celular de los MEFS, tanto por tinción del contenido de DNA de las células como por detección del EdU añadido al medio de cultivo. Además, también se aprovechó este método para la detección de marcadores de daño mediante el uso de técnicas inmunológicas.

Los MEFs destinados a experimentos de citometría se recogieron por tripsinización a una densidad aproximada de 80-90%. Después de bajar el pellet celular centrifugando 5 min a 1500 rpm y a 4°C, y de lavar una vez con PBS, se fijaron las células con PF 4% durante 15 min. Las células fijadas con PF se guardaron a 4°C durante varios días o se procesaron en el momento para ser analizadas en el citómetro. Tras un lavado generoso con PBS, se procedió a la permeabilización celular con EtOH al 70% (-20°C) durante 30 min a 4°C. Una vez permeabilizadas las células, en el supuesto de que estuvieran marcadas con EdU se procedió a realizar la reacción para la detección del análogo, según las instrucciones del fabricante. Cuando, adicionalmente, se realizó una detección inmunológica con anticuerpos fue preciso efectuar un bloqueo durante 30 min con 10% suero de cabra en PBS. En el caso de la identificación de señal de daño en el DNA, se utilizó un anticuerpo contra la histona fosforilada  $\gamma$ H2AX acoplado a un fluorocromo, en este caso la *Alexa Fluor® 647*. La incubación con el anticuerpo se realizó a TA durante 1 h, asegurándonos de agitar regularmente las muestras para que el marcaje fuera eficiente. La preparación de las muestras se completó con la tinción del DNA con el compuesto 7-AAD (7-amino-actinomicina D) de *Life Technologies* a una concentración de 1  $\mu$ g/mL, añadiendo de manera simultánea RNasa (100  $\mu$ g/mL). Para garantizar la correcta incorporación de este compuesto al DNA celular, se mantuvieron las

muestras al menos 30 min a 37°C o alternativamente se guardaron a 4°C para ser analizadas al día siguiente en el citómetro, en ambos casos, eso sí, protegidas de la luz.

Para la adquisición de las muestras se utilizó un citómetro *FACSCalibur™* de *BD*, equipado con 4 canales de detección, lo que permite combinar en una misma célula hasta 4 fluoróforos con distintas longitudes de onda de emisión. En nuestro caso, combinamos simultáneamente el A-488 (EdU), el 7-AAD y el A-647 ( $\gamma$ H2AX). Para la captura de las muestras se usó el programa informático *CellQuest™ Pro* (*BD*), asociado al citómetro. Se adquirieron, siempre y cuando el número de células lo permitió,  $1 \times 10^5$  eventos por cada muestra analizada.

En cuanto al análisis posterior de los datos y composición de gráficos se hizo uso del *FlowJo*, paquete informático especializado en el procesamiento de datos de citometría.

### 13. Tratamiento de datos y análisis estadísticos

Para el procesamiento de los datos obtenidos, realización de gráficas y ejecución de los análisis estadísticos pertinentes se utilizó el *Excel* (*Microsoft Office*) y el paquete estadístico *Prism 6* (*GraphPad*). Para la obtención de los datos de cada experimento se procuró contar con al menos 3 experimentos independientes realizados en las mismas condiciones.

En los casos en los que los valores se ajustaran a una distribución normal, el análisis aplicado fue el de la *t* de Student.

En el caso particular de los ensayos de fibras y ensayos del cometa, al tratarse de una población de datos que no se ciñe a una distribución normal, se tomó la mediana como valor de referencia, y los análisis estadísticos efectuados entre cada conjunto de datos fueron estudios no paramétricos (prueba de Mann-Whitney).

Para todos los casos, se consideraron las diferencias estadísticamente significativas cuando  $p < 0,05$ . Asimismo se establecieron distintos grados de significancia en función del valor de *p*: \* ( $p < 0,05$ ); \*\* ( $p < 0,01$ ); \*\*\* ( $p < 0,001$ ); \*\*\*\* ( $p < 0,0001$ ).



# *Resultados*

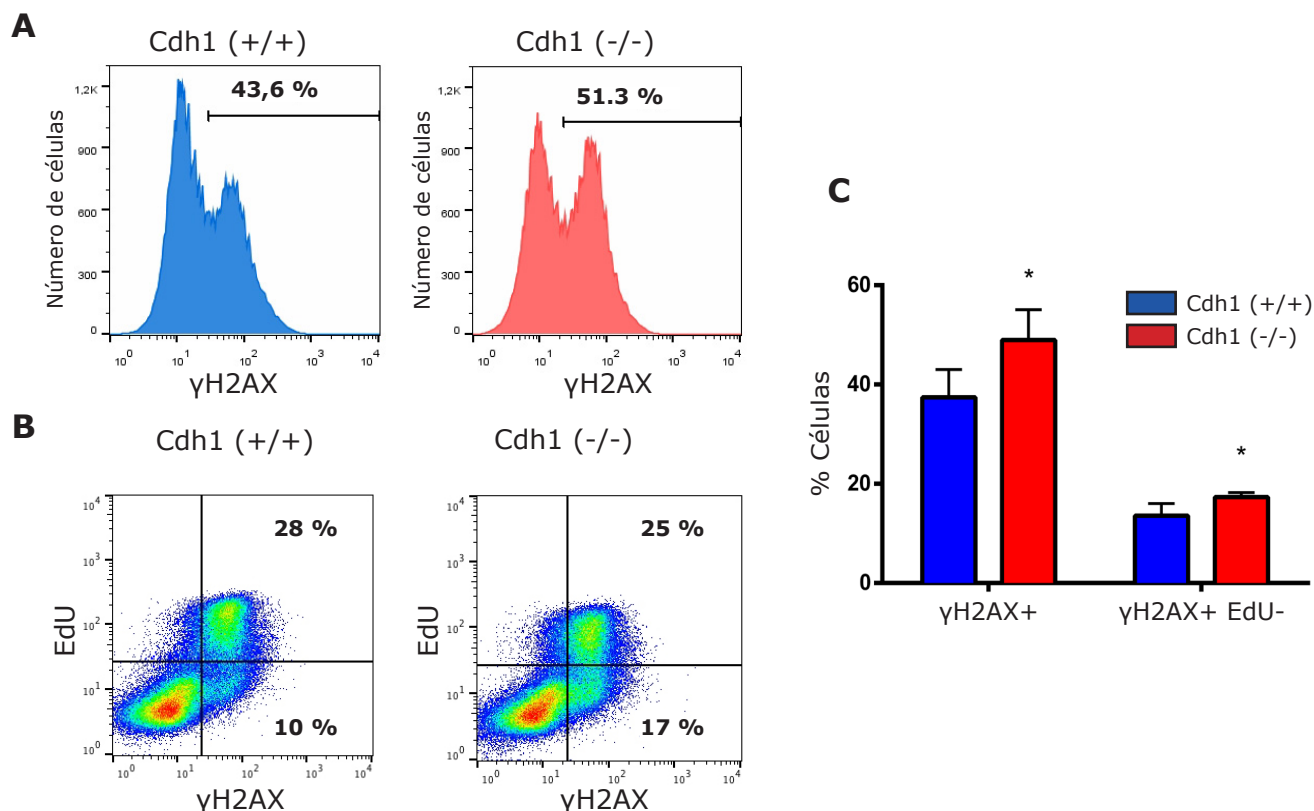


## 1. Papel de Cdh1 en el mantenimiento de la estabilidad genómica

Estudios previos de nuestro grupo y de otros indican que la ausencia de Cdh1 induce aberraciones cromosómicas numéricas y estructurales y, en definitiva, un aumento de la inestabilidad cromosómica (García-Higuera *et al.*, 2008; Engelbert *et al.*, 2008; revisado en Wäsch *et al.*, 2010). Para poder ahondar en el origen de dicha inestabilidad quisimos primero caracterizar en mayor detalle las consecuencias que, sobre la integridad genómica, podía tener la falta de Cdh1. Para ello, establecimos cultivos primarios de fibroblastos murinos (MEFs) a partir de embriones control (Cdh1 (+/lox), a los que por simplificar denominaremos Cdh1 (+/+)), y de embriones deficientes en Cdh1 o *knockout* (KO) para Cdh1 (Cdh1(-/lox); Sox2-Cre, a los que por simplificar denominaremos Cdh1(-/-)). Paralelamente, también establecimos cultivos de MEFs a partir de embriones portadores del alelo condicional de Cdh1 (Cdh1 (lox/lox) o Cdh1 (-/lox)) en los cuales indujimos la escisión del alelo de Cdh1 mediante infección con adenovirus portadores de la Cre recombinasa (Adeno-Cre). En este caso, como control utilizamos las mismas células infectadas con un adenovirus que no expresa ninguna proteína exógena (adenovirus control). En algunos experimentos se incluyó, además, un control de MEFs silvestres (a los que denominamos Cdh1 (wt/wt)) que infectamos con los mismos adenovirus para poder valorar el efecto de la expresión de la recombinasa Cre en células en las que no se produce la escisión de Cdh1.

### 1.1. La ausencia de Cdh1 incrementa las roturas de doble cadena (DSBs) en el DNA

Para determinar si en ausencia de Cdh1 se genera, espontáneamente, daño en el DNA, optamos por la detección de la forma fosforilada de la histona H2AX (fosforilación en la Ser139 mediada por ATM, ATR o DNA-PK) comúnmente aceptada como marcador de roturas de doble cadena (Rogakou *et al.*, 1998; Burma *et al.*, 2001). En primer lugar, valoramos la expresión de  $\gamma$ H2AX por citometría de flujo, analizando MEFs primarios de los distintos genotipos marcados con un anticuerpo específico para  $\gamma$ H2AX. Como se observa en las **Figuras 1 y 2**, tanto los cultivos de MEFs constitutivamente deficientes en Cdh1 como aquellos derivados del modelo condicional e infectados con Adeno-Cre, muestran un mayor porcentaje de células positivas para la histona fosforilada, sugiriendo una mayor presencia de roturas de doble cadena ante la pérdida o depleción de Cdh1. En estos experimentos se aprovechó para incubar las células con el análogo de timidina, EdU, durante dos horas antes de recogerlas, lo que nos permitió posteriormente (tras realizar el marcaje correspondiente) identificar las células que lo habían incorporado y por tanto estaban replicando su DNA. De este modo pudimos comprobar que el daño endógeno en los MEFs carentes de Cdh1 no se limitaba a la fase S, sino que aparecía también en células que no estaban replicando (**Fig. 1C y Fig. 2B**,  $\gamma$ H2AX+ EdU-). Es decir, que buena parte de las roturas

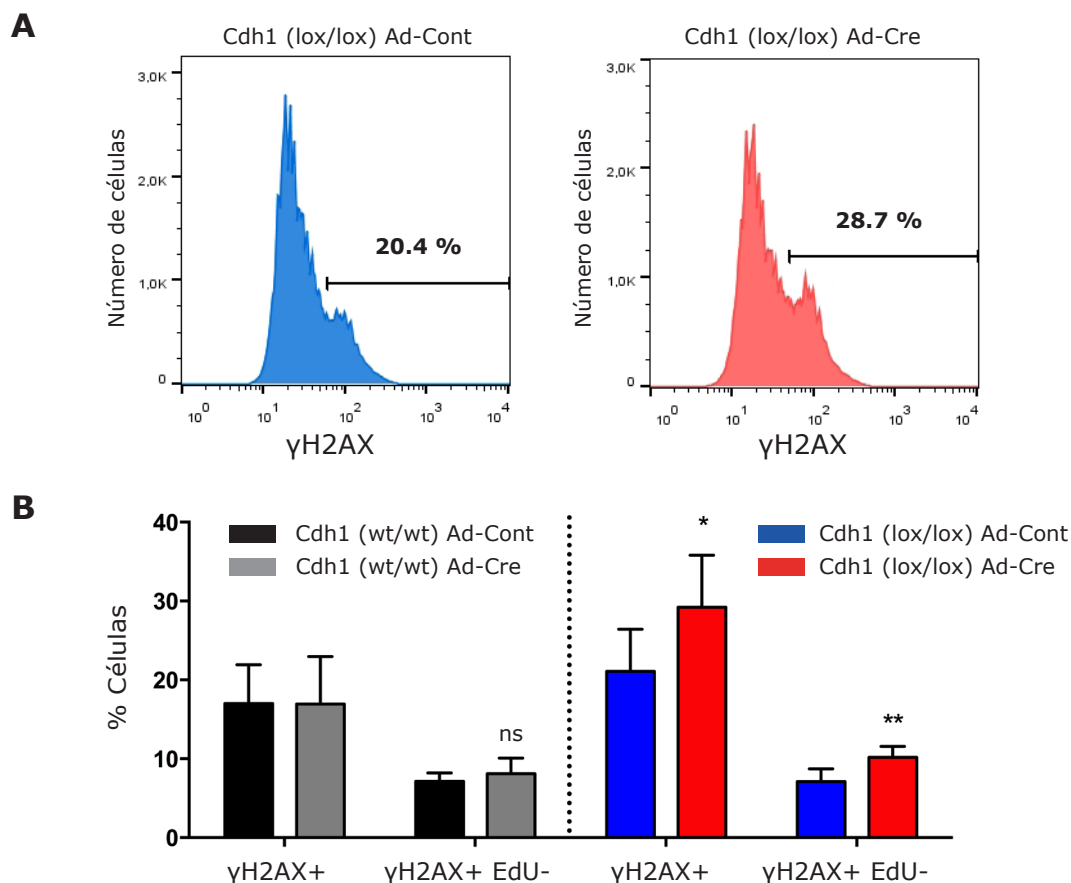


**Figura 1. Los MEFs constitutivamente deficientes en Cdh1 muestran niveles incrementados de  $\gamma$ H2AX con respecto a los MEFs control.** **A.** Perfiles representativos de inmunodetección de  $\gamma$ H2AX por citometría de flujo en cultivos asíncronos de MEFs control o deficientes en Cdh1. Se indica el porcentaje de células positivas para la fosfo-histona. **B.** Dos horas antes de recoger y fijar las células, se incubaron en presencia de EdU 10  $\mu$ M. Gráfico representativo de la distribución de la población celular con respecto a la expresión de  $\gamma$ H2AX y a la incorporación de EdU en una pareja de MEFs control y mutantes para Cdh1. **C.** Resumen de la cuantificación por citometría de flujo de células positivas para la fosfo-histona, o positivas para la fosfo-histona pero negativas para EdU en cultivos control (azul) o deficientes en Cdh1 (rojo) (n=6). (\*p<0,05).

se estarían produciendo tras completar el grueso de la replicación (en G2 o durante la mitosis), o bien, se estarían generando durante la fase replicativa pero persistirían más allá de la misma.

Para confirmar los resultados anteriores, se procedió igualmente a valorar la presencia de focos de  $\gamma$ H2AX por inmunofluorescencia, marcando de nuevo los cultivos con EdU durante 2h antes de fijar las células. De forma similar, se detectó un mayor porcentaje de células con focos de  $\gamma$ H2AX en el caso de los MEFs deficientes en Cdh1 (**Figura 3**, Cdh1(-/-)) o deplecionados de Cdh1 (**Figura 3**, Ad-Cre) en relación a sus respectivos controles (Figura 2, Cdh1(+/+), Ad-Cont). En este caso, no obstante, el incremento de la señal de daño solamente fue estadísticamente significativo en las células en las que se produjo la depleción aguda de Cdh1, sugiriendo que la ausencia constitutiva de Cdh1 podría estar activando mecanismos compensatorios que atenuarían el fenotipo.

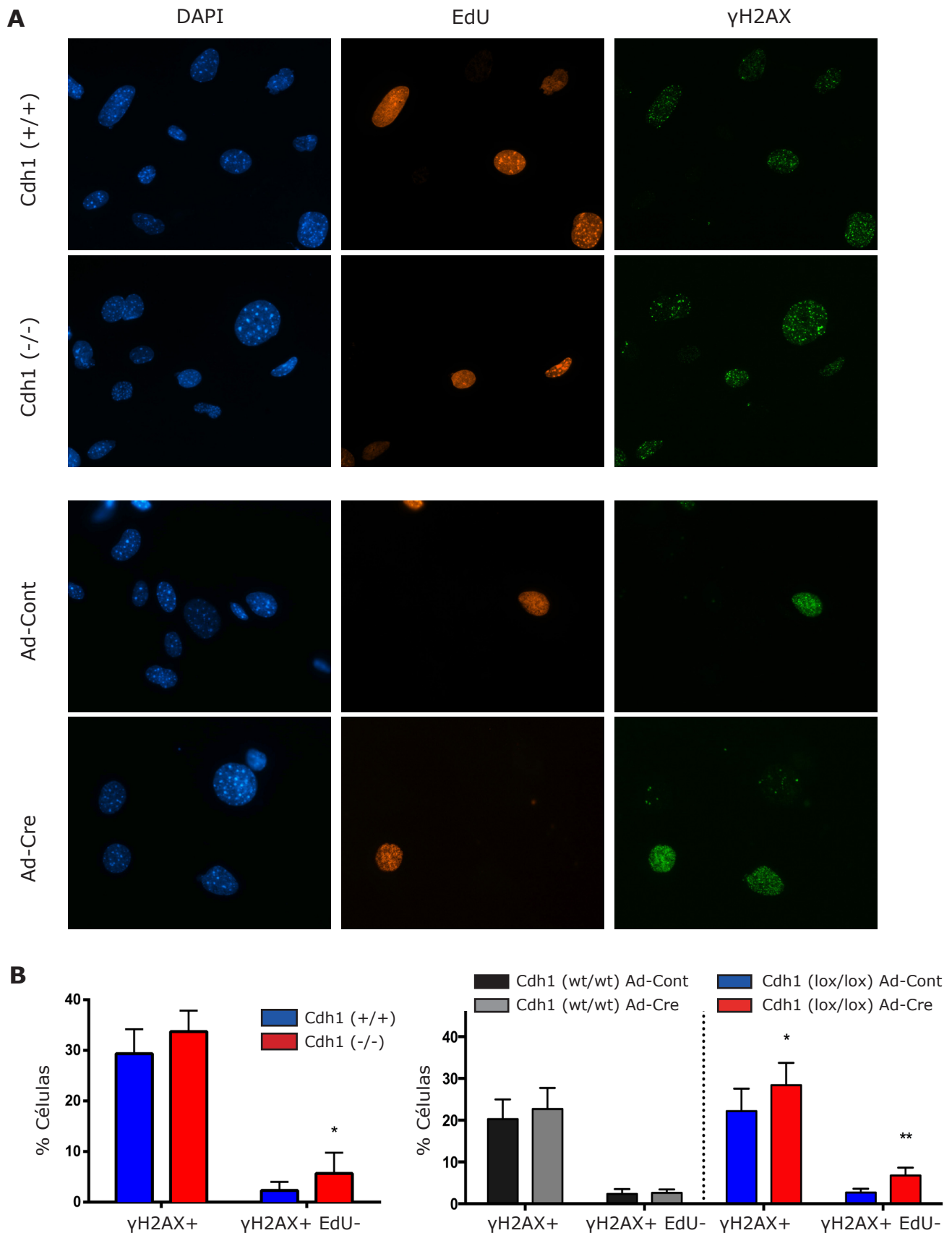
La fosforilación de H2AX en la Ser139 no parece ser un evento disparado exclusivamente por las roturas de doble cadena genotóxicas, sino que se puede producir incluso de manera



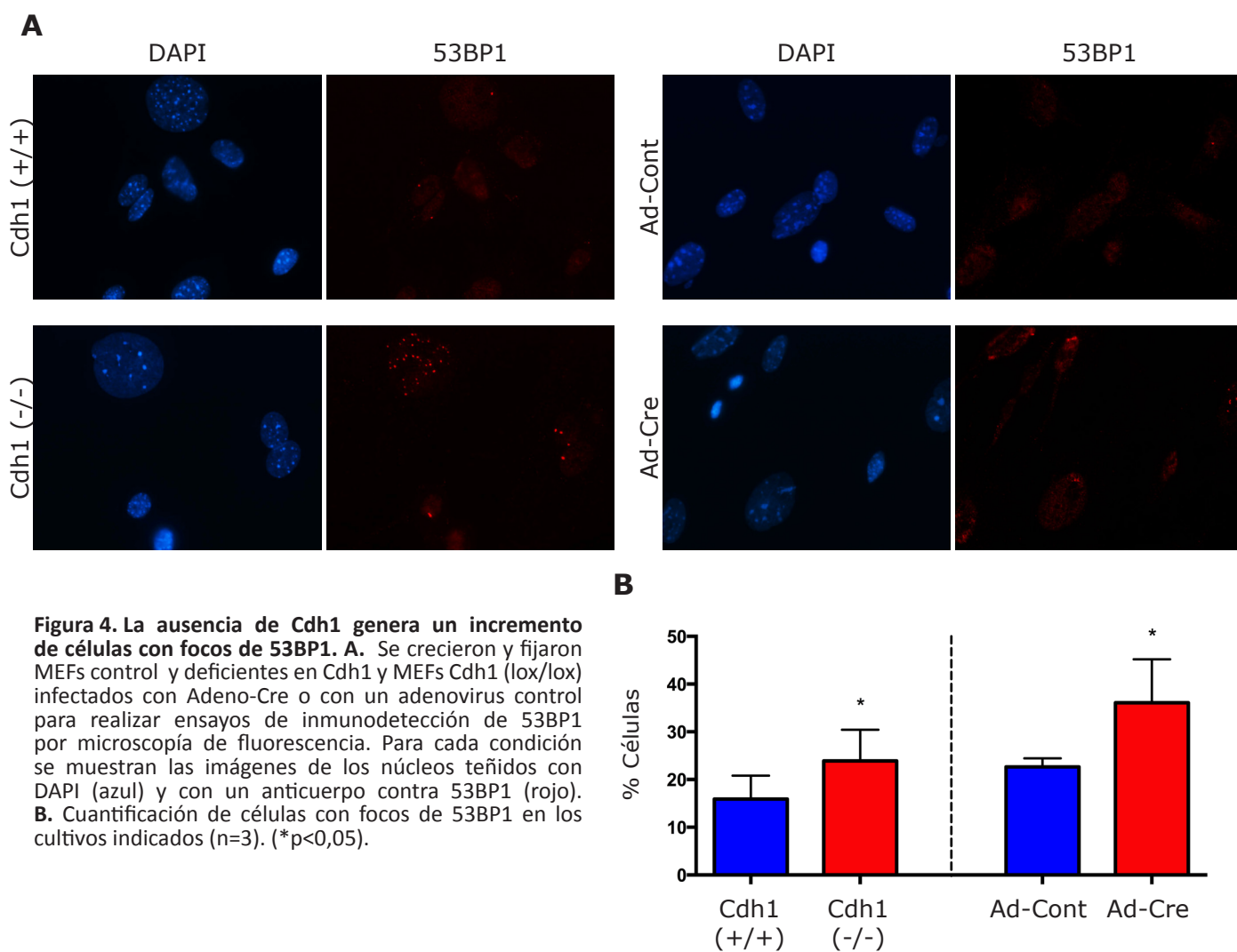
**Figura 2. La delección aguda de Cdh1 también induce un aumento del daño endógeno.** **A.** Histogramas representativos de la detección de γH2AX por citometría de flujo en MEFs Cdh1 (lox/lox) infectados con Adeno-Cre (derecha) o con un adenovirus control (izquierda) **B.** Cuantificación de los niveles de γH2AX detectados por citometría en cultivos de MEFs silvestres (izquierda de la raya discontinua) o portadores del alelo condicional de Cdh1 (derecha de la raya discontinua) infectados con Adeno-Cre o con un adenovirus control (n=6). (\*p<0,05; \*\*p<0,01).

ordinaria durante una fase de replicación normal (Podhorecka *et al.*, 2010). Por eso, en los últimos tiempos se vienen utilizando de manera complementaria otros marcadores de daño más específicos, como 53BP1. El reclutamiento de 53BP1 a los sitios de daño es dependiente de γH2AX y da lugar a unos focos característicos en las regiones que han sufrido roturas de doble cadena, visibles por inmunofluorescencia (Lukas *et al.*, 2011; Panier y Boulton, 2014). Por tanto, al objeto de cuantificar los focos de 53BP1 por microscopía, se realizaron tinciones de los distintos tipos de MEFs con un anticuerpo específico contra 53BP1. Los resultados obtenidos (**Figura 4**) corroboraron las observaciones realizadas en relación a γH2AX. De nuevo, el número relativo de células con focos de 53BP1 era mayor en el caso de los MEFs primarios deficientes en Cdh1 (Cdh1(-/-)) que en las células control (Cdh1(+/+)), y también era superior en los MEFs Cdh1 (lox/lox) infectados con Adeno-Cre (Ad-Cre) que en los infectados con un adenovirus control (Ad-Cont).

Una de las técnicas más utilizadas para detectar roturas en el DNA es el ensayo del cometa (también conocido como *Single Cell Gel Electrophoresis* o *SCGE*), que permite visualizar el DNA

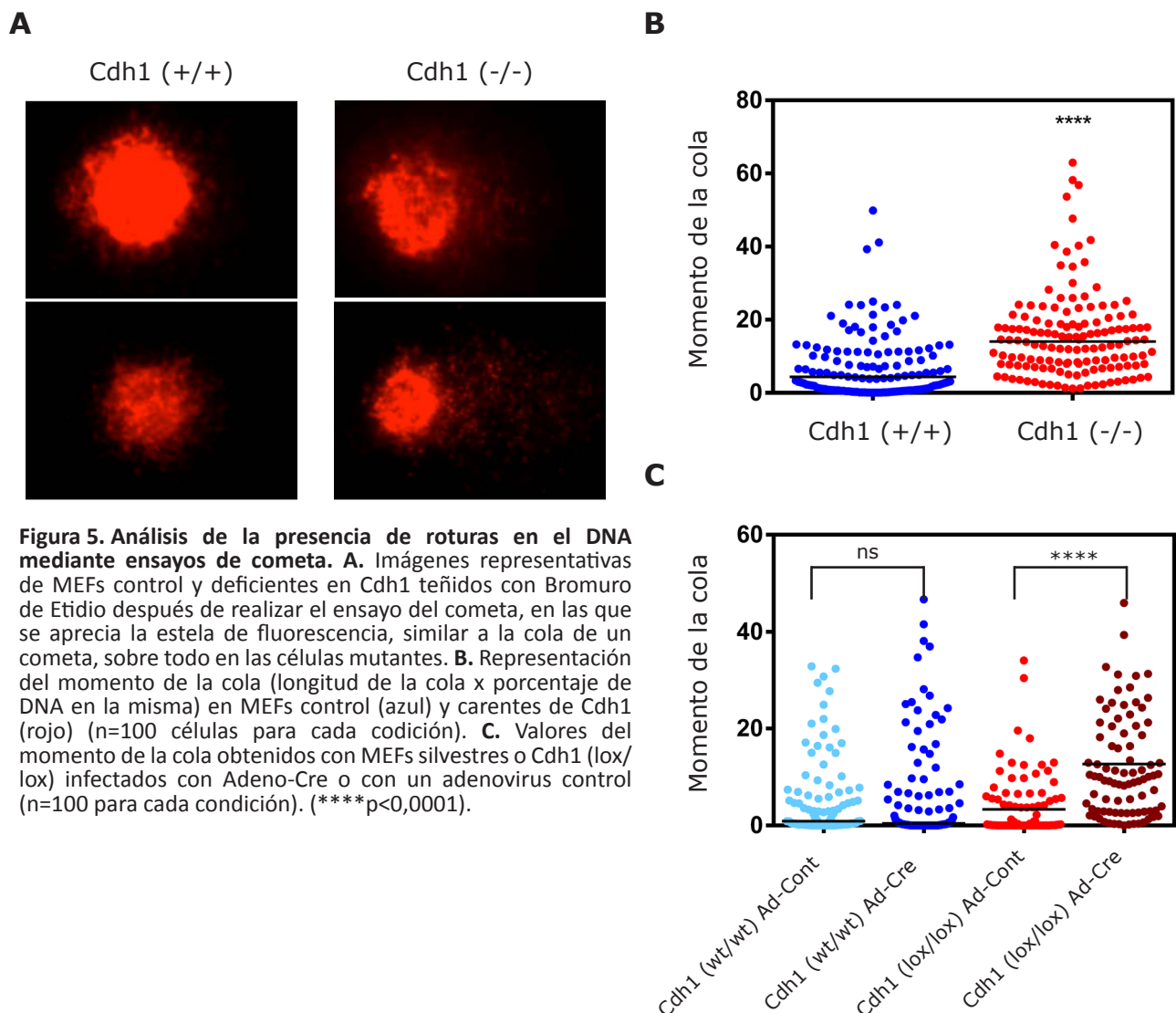


**Figura 3.** Los cultivos de MEFs carentes o deplecionados de Cdh1 también muestran mayor proporción de células con focos de  $\gamma$ H2AX. A. Imágenes representativas de cultivos asíncronos de MEFs control y deficientes en Cdh1 (paneles superiores) o portadores del alelo condicional de Cdh1 e infectados con Adeno-Cre o con un adenovirus control y recogidos a día 7 tras la infección (paneles inferiores). Se muestran en la primera columna las fotografías de los núcleos teñidos con DAPI; en la segunda, las células que son positivas para EdU (en rojo) y que por tanto se encuentran en fase S (marcaje con EdU 10  $\mu$ M durante las 2 horas previas a la recogida); y en la tercera columna, en verde, aparecen las células con focos de  $\gamma$ H2AX. B. Cuantificación de las células con focos de  $\gamma$ H2AX. En el panel izquierdo se muestran los resultados obtenidos con MEFs control (azul) y deficientes en Cdh1 (rojo). En el panel derecho, los correspondientes a MEFs silvestres (a la izquierda de la línea discontinua) o bien MEFs Cdh1 (lox/lox) (a la derecha de la línea discontinua) infectados con Adeno-Cre o con un adenovirus control. Se aunarón los datos de ocho experimentos independientes (n=8), contando en cada uno de ellos al menos 100 células por condición para realizar el análisis. (\*p<0,05; \*\*p<0,01).



**Figura 4. La ausencia de Cdh1 genera un incremento de células con focos de 53BP1. A.** Se crecieron y fijaron MEFs control y deficientes en Cdh1 y MEFs Cdh1 (lox/lox) infectados con Adeno-Cre o con un adenovirus control para realizar ensayos de inmunodetección de 53BP1 por microscopía de fluorescencia. Para cada condición se muestran las imágenes de los núcleos teñidos con DAPI (azul) y con un anticuerpo contra 53BP1 (rojo). **B.** Cuantificación de células con focos de 53BP1 en los cultivos indicados (n=3). (\*p<0,05).

de células individuales sometido a electroforesis, y comparar la magnitud del daño en cada célula (Collins, 2004; Olive y Banáth, 2006). Así, el DNA intacto (superenrollado) formará la “cabeza” del cometa, mientras que el DNA fragmentado o con roturas que relajen su estructura, se desplazará ligeramente hacia el ánodo y formará la cola del cometa. Teniendo esto en cuenta decidimos emplear esta técnica para demostrar inequívocamente que la ausencia de Cdh1 provoca la acumulación de roturas en el genoma. Realizamos la lisis y posterior desnaturalización del DNA a pH básico para poder valorar tanto roturas de cadena sencilla como roturas de doble cadena. Los resultados obtenidos fueron bastante clarificadores. Como se aprecia en la **Fig. 5A**, la estela que forman las células carentes de Cdh1 tras la electroforesis, es más acentuada que la de las células control, indicando por tanto una mayor rotura del DNA de las células mutantes. El parámetro empleado para cuantificar la presencia de DNA en la cola del cometa es el momento de la cola, que aúna la longitud de la cola y la intensidad de la misma. Pues bien, la valoración de este parámetro en no menos de 100 células de cada genotipo, reveló diferencias altamente significativas tanto entre las células control y deficientes en Cdh1 (**Fig. 5B**) como entre las células Cdh1(lox/lox) infectadas con adeno-Cre o con un adenovirus control (**Fig. 5C**). En este caso comprobamos, de nuevo, que la aparición de roturas



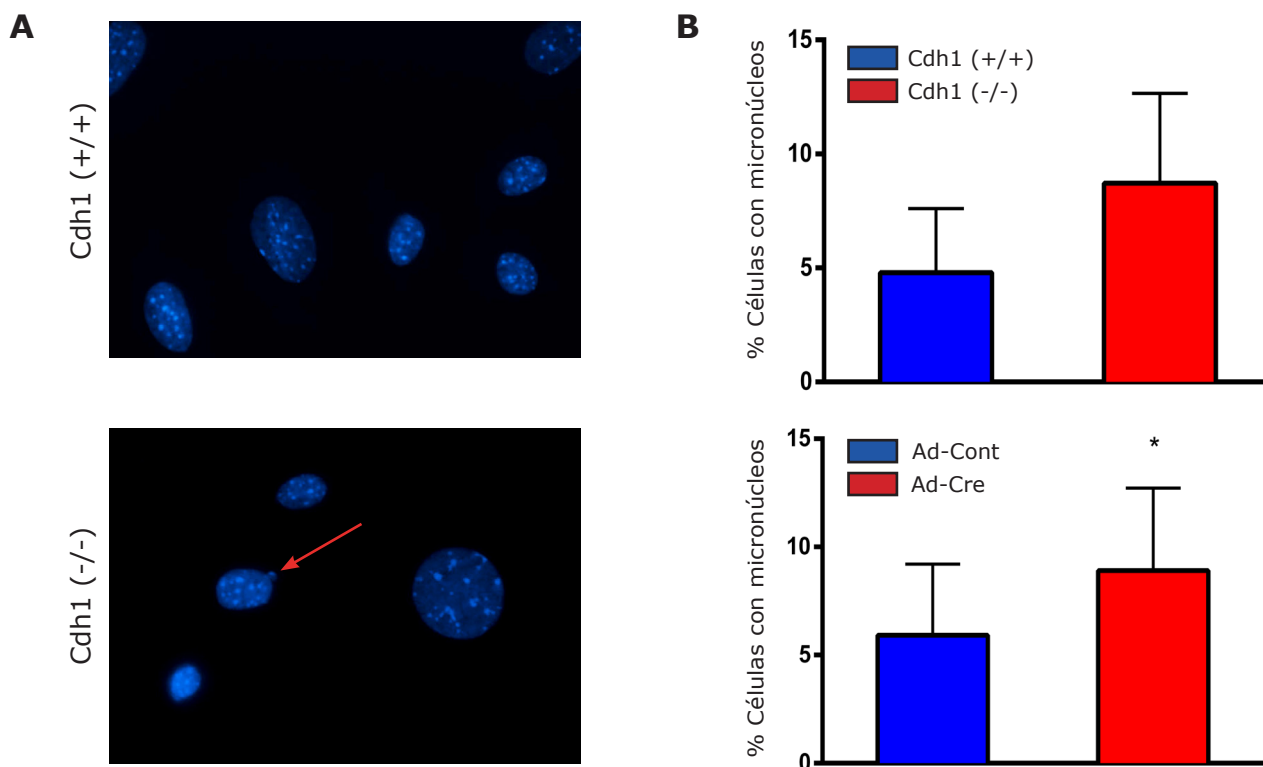
**Figura 5. Análisis de la presencia de roturas en el DNA mediante ensayos de cometa.** **A.** Imágenes representativas de MEFs control y deficientes en Cdh1 teñidos con Bromuro de Etidio después de realizar el ensayo del cometa, en las que se aprecia la estela de fluorescencia, similar a la cola de un cometa, sobre todo en las células mutantes. **B.** Representación del momento de la cola (longitud de la cola x porcentaje de DNA en la misma) en MEFs control (azul) y carentes de Cdh1 (rojo) (n=100 células para cada codición). **C.** Valores del momento de la cola obtenidos con MEFs silvestres o Cdh1 (lox/lox) infectados con Adeno-Cre o con un adenovirus control (n=100 para cada condición). (\*\*\*\*p<0,0001).

no estaba relacionada con la expresión de la recombinasa sino con la depleción de Cdh1, puesto que la infección de MEFs silvestres (Cdh1(+/+)) con el mismo adeno-Cre no produjo un aumento de las roturas con respecto a las células infectadas con un adenovirus control (**Fig. 5C**).

## 1.2. La pérdida de Cdh1 determina la aparición de otras evidencias de daño en el DNA

Los micronúcleos, estructuras esféricas con DNA fuera del núcleo celular, constituyen marcadores biológicos de inestabilidad comosómica. Su número aumenta tanto tras la exposición a agentes genotóxicos como en situaciones de daño endógeno provocado, por ejemplo, por estrés replicativo (Xu *et al.*, 2011). Se producen durante la segregación mitótica como consecuencia de alteraciones en el propio proceso de segregación o bien por la existencia de lesiones no reparadas que conducen a la fragmentación cromosómica (Fenech *et al.*, 2011). Aprovechando que no se requieren ensayos específicos para su visualización por microscopía de fluorescencia, ya que basta una simple tinción del DNA con DAPI, decidimos valorar la presencia

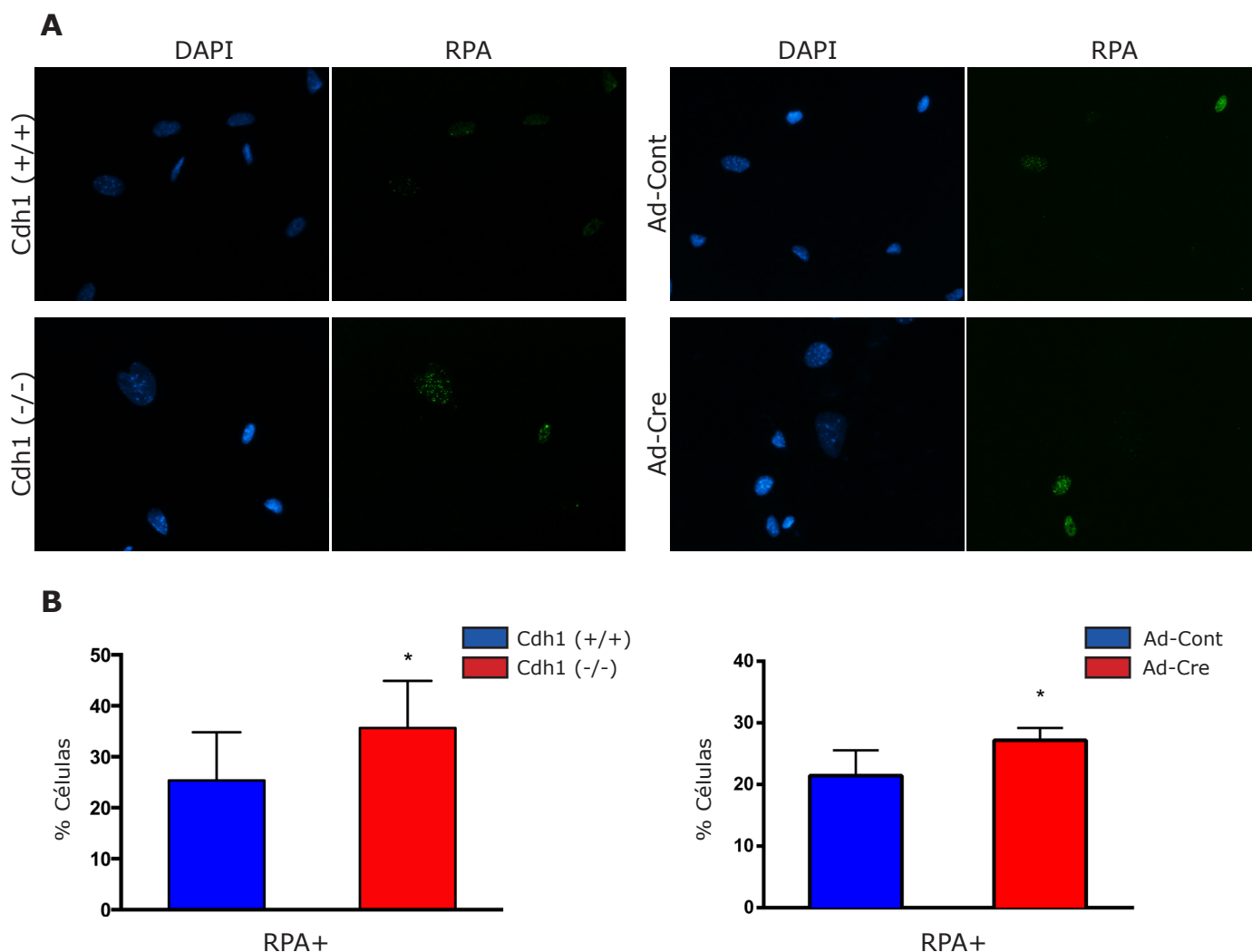




**Figura 6. Cuantificación de micronúcleos en cultivos de MEFs carentes de Cdh1.** **A.** Imágenes representativas de la detección de micronúcleos por microscopía de fluorescencia (flecha roja) en cultivos de MEFs deficientes en Cdh1. **B.** Cuantificación del porcentaje de células con micronúcleos en cultivos control y mutantes para Cdh1 (panel superior) y en cultivos de MEFs Cdh1 (lox/lox) infectados con un adenovirus control o con adeno-Cre (panel inferior). Se contaron al menos 100 células de cada condición, cuantificando como positivas aquellas células que mostraban uno o más micronúcleos en las proximidades de su núcleo celular por tinción con DAPI.

de estas estructuras en MEFs control y mutantes. Tanto en los MEFs constitutivamente deficientes en Cdh1 como en los condicionales infectados con Adeno-Cre se observó una tendencia al incremento de células con micronúcleos (**Figura 6**), si bien el análisis estadístico solamente detectó diferencias significativas en los experimentos realizados en los condicionales.

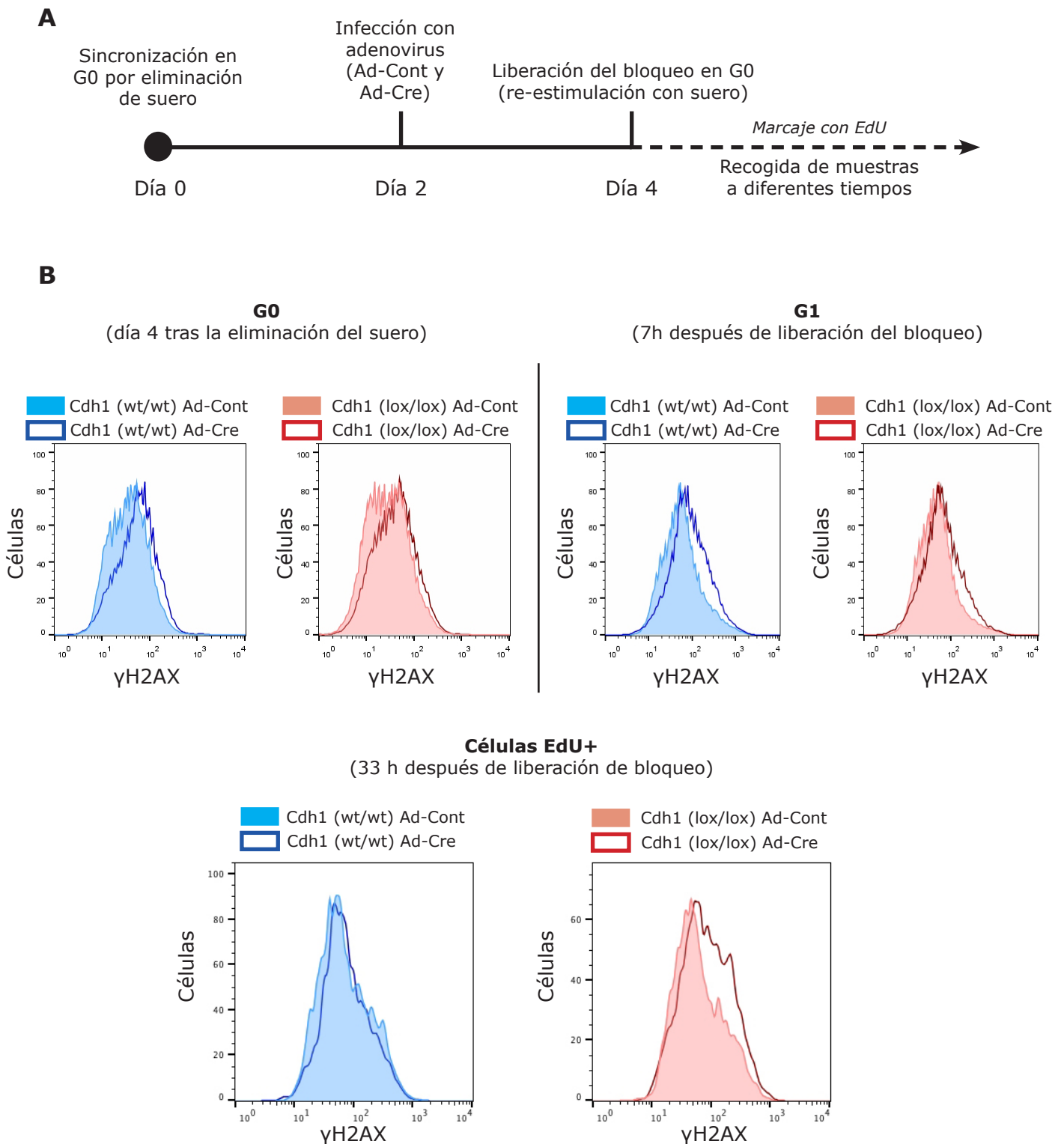
Por otra parte, una de las principales fuentes endógenas de daño espontáneo en el DNA es el estrés replicativo. Como ya se ha comentado en la introducción, en situaciones de estrés replicativo, y como consecuencia del desacoplamiento entre la polimerasa y la helicasa del replisoma, se generan largos segmentos de DNA de cadena sencilla que serán rápidamente recubiertos por RPA (Ben-Yehoyada *et al.*, 2007; Willis y Rhind, 2009; López-Contreras y Fernández-Capetillo, 2010). Por ese motivo, es posible visualizar dichos segmentos monocatenarios utilizando anticuerpos específicos contra RPA. Realizando este tipo de tinción en cultivos de MEFs deficientes en Cdh1 o deplecionados de Cdh1, comprobamos que tanto la ausencia constitutiva de Cdh1, como la inducida por Cre, originan un aumento significativo del número de células con focos de RPA (**Figura 7**). Este resultado sugiere que la falta de Cdh1 podría inducir estrés replicativo y este estrés replicativo, a su vez, podría impulsar la aparición de roturas en el DNA.



**Figura 7. El porcentaje de células con focos de RPA es superior en los cultivos de MEFs deficientes en Cdh1 y en los que se indujo la escisión aguda de los alelos de *Cdh1*. A.** Detección de regiones de cadena sencilla por inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo contra RPA32 en cultivos de MEFs control y deficientes en Cdh1, o bien portadores del alelo condicional de Cdh1 infectados con Adeno-cre o con un adenovirus control. En verde, se muestran las células con focos de RPA, y por tanto, con regiones monocatenarias de DNA. **B.** Cuantificación de células con focos de RPA en los cultivos de MEFs indicados. (n=8 para los ensayos con los MEFs constitutivos y n=4 para los experimentos con los MEFs condicionales). \*p<0,05.

### 1.3. El paso por fase S de los MEFs deficientes en Cdh1 determina la aparición de los signos de daño en el DNA

El siguiente paso para tratar de identificar el origen del daño generado en ausencia de Cdh1 fue investigar si el paso por fase S era un requisito necesario para la aparición de las roturas. Para ello diseñamos un experimento que nos permitía deplecionar Cdh1 en células quiescentes y monitorizar la expresión de marcadores de daño a lo largo del primer ciclo de división en ausencia del cofactor de APC/C. Así, sincronizamos MEFs Cdh1 (lox/lox) en G0 por privación de suero y los infectamos con Adeno-Cre (o con un adenovirus control) para inducir la delección de



**Figura 8. El paso por fase S determina la aparición de daño endógeno en el DNA tras la delección de Cdh1. A.** Esquema del diseño experimental del ensayo. Se sincronizaron cultivos de MEFs control o Cdh1 (lox/lox) en G0 por eliminación del suero (0,5 % FBS), y a las 48 h se procedió a la infección con los adenovirus. Se mantuvieron las células 48 h más en medio sin suero, y se indujo la reentrada en ciclo celular añadiendo suero al medio de cultivo. Se recogieron muestras a distintos tiempos tras la liberación del bloqueo (0, 7, 20, 25, 28, 33 y 36 horas), marcando previamente los cultivos con EdU en un pulso de 60 min a las 19 h de la entrada en ciclo (para poder identificar a partir de ese momento las células que sí habían replicado su DNA). **B.** Se muestran los histogramas de detección de  $\gamma$ H2AX por citometría de flujo para las muestras correspondientes a las fases G0 y G1 (tiempo 0 y 7 h tras la liberación, respectivamente) y también para las muestras que ya habían pasado por fase S (33 h). Para cada muestra aparecen superpuestos los histogramas correspondientes a la infección con Adeno-Cre o con el adenovirus control.

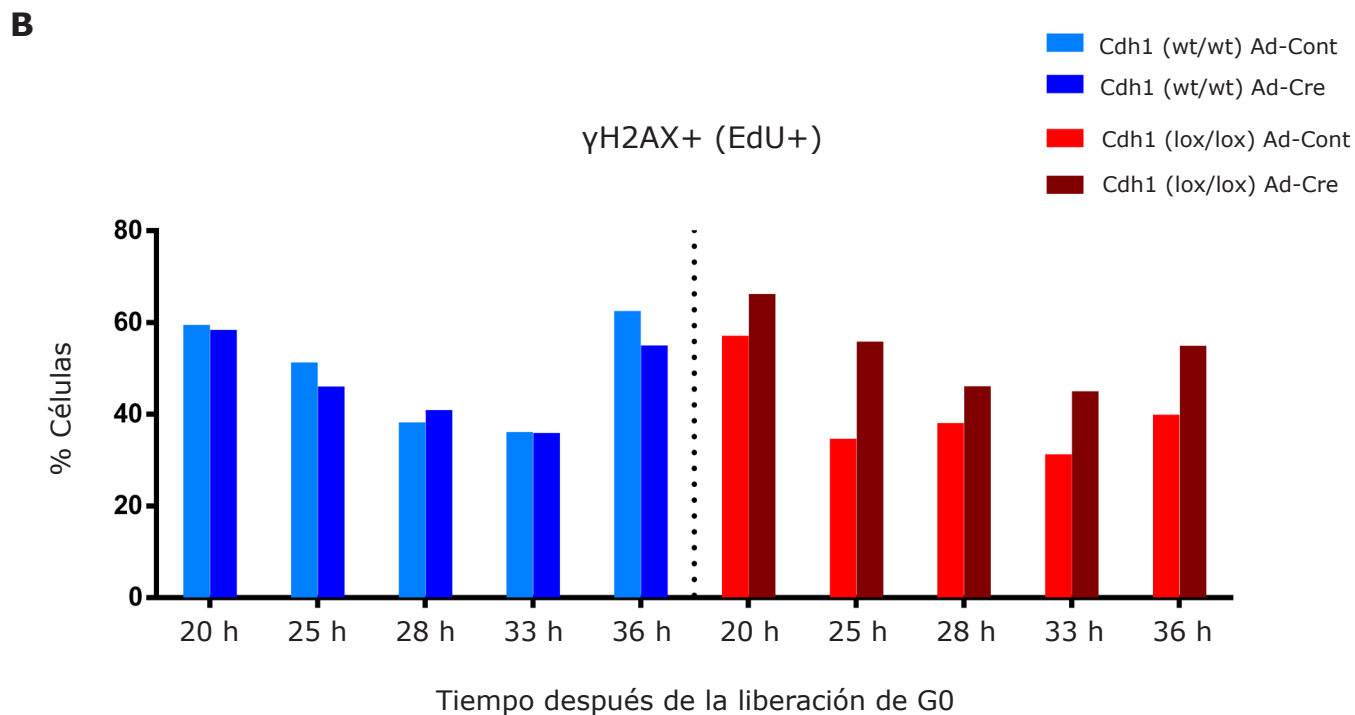
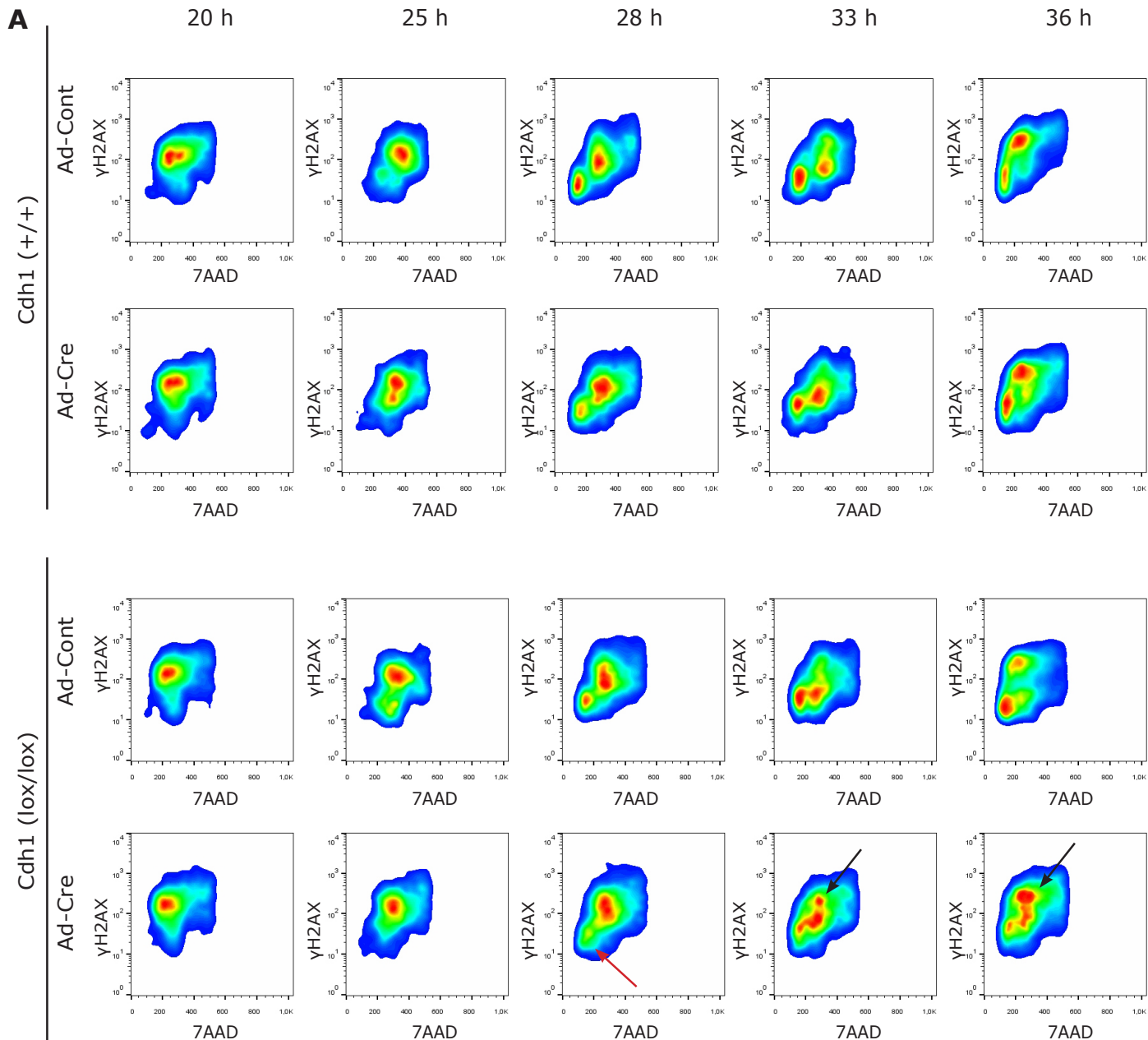
Cdh1 en quiescencia. Posteriormente, liberamos los cultivos del bloqueo en G0 y estimulamos su re-entrada en ciclo reponiendo suero al medio de cultivo. Diecinueve horas después del cambio de medio, momento en el que buena parte de las células deberían estar ya replicando su DNA, marcamos los cultivos con EdU para poder realizar un seguimiento detallado de las células que hubieran transitado por fase S. Se recogieron muestras a distintos tiempos tanto antes como después del pulso con EdU (y en el caso de las primeras se añadió EdU al medio de cultivo una hora antes de la recogida) y se valoró la presencia de daño mediante análisis por citometría de flujo de la expresión de  $\gamma$ H2AX (**Fig. 8A**). En paralelo se llevó a cabo un abordaje idéntico con MEFs silvestres para evaluar la contribución de la expresión de la recombinasa Cre a la generación de daño. En primer lugar comprobamos que en las muestras recogidas a tiempo 0 (células en G0) o en las primeras horas tras el cambio a medio completo, cuando las células aún no han iniciado la replicación, el perfil de detección de  $\gamma$ H2AX es prácticamente idéntico en células infectadas con Adeno-Cre y con el adenovirus control en los MEFs Cdh1 (+/+) y Cdh1 (lox/lox) (**Fig. 8B**).

Sin embargo, a partir de las 20-25 horas, momento en el que la mayoría de células ya han entrado en fase S o incluso la han completado, el perfil de detección de  $\gamma$ H2AX muestra un pico adicional de células con mayor expresión de la histona fosforilada en las muestras de MEFs Cdh1 (lox/lox) infectados con Adeno-Cre con respecto a los infectados con adenovirus control, que no aparece en muestras equivalentes de MEFs silvestres (**Fig. 9**). Estos resultados indican que las células deplecionadas de Cdh1 solo acumulan daño si replican su DNA y no lo hacen si se mantienen quiescentes o durante la fase G1. Por otro lado, los diagramas combinados de  $\gamma$ H2AX y contenido en DNA (**Fig. 9A**) revelan que tras la replicación, una importante fracción de las células deplecionadas de Cdh1 se acumulan en G2/M y muestran expresión de  $\gamma$ H2AX, sugiriendo un retraso en la transición G2/M o en la progresión por la fase M posiblemente como consecuencia del daño acumulado.

### **1.4. Las células carentes de Cdh1 muestran una activación moderada de la ruta de respuesta a daño**

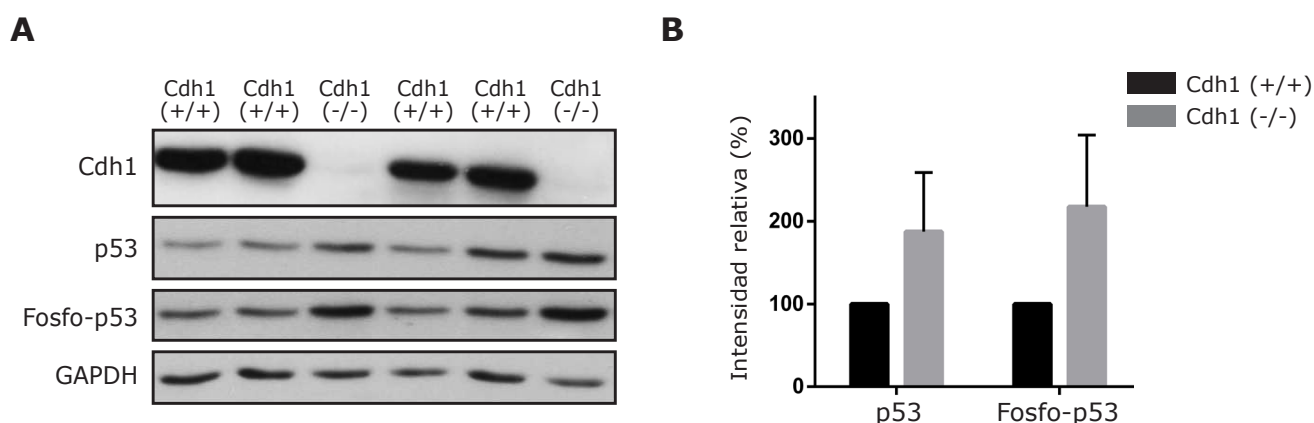
Dado que los MEFs que carecen de Cdh1 muestran, como hemos visto, síntomas de sufrir algún tipo de daño endógeno en el DNA, consideramos analizar la activación de la ruta de respuesta al daño en ausencia del cofactor de APC/C.

Para ello determinamos los niveles de algunas de las proteínas que participan en esta vía, como p53, su forma fosforilada en el residuo Ser15 (fosfo-p53) o la forma fosforilada en Ser317 de Chk1 (fosfo-Chk1) por *Western Blot*. Aunque existe una cierta variabilidad y no todos los cultivos de MEFs del mismo genotipo se comportan exactamente de la misma manera, en general los



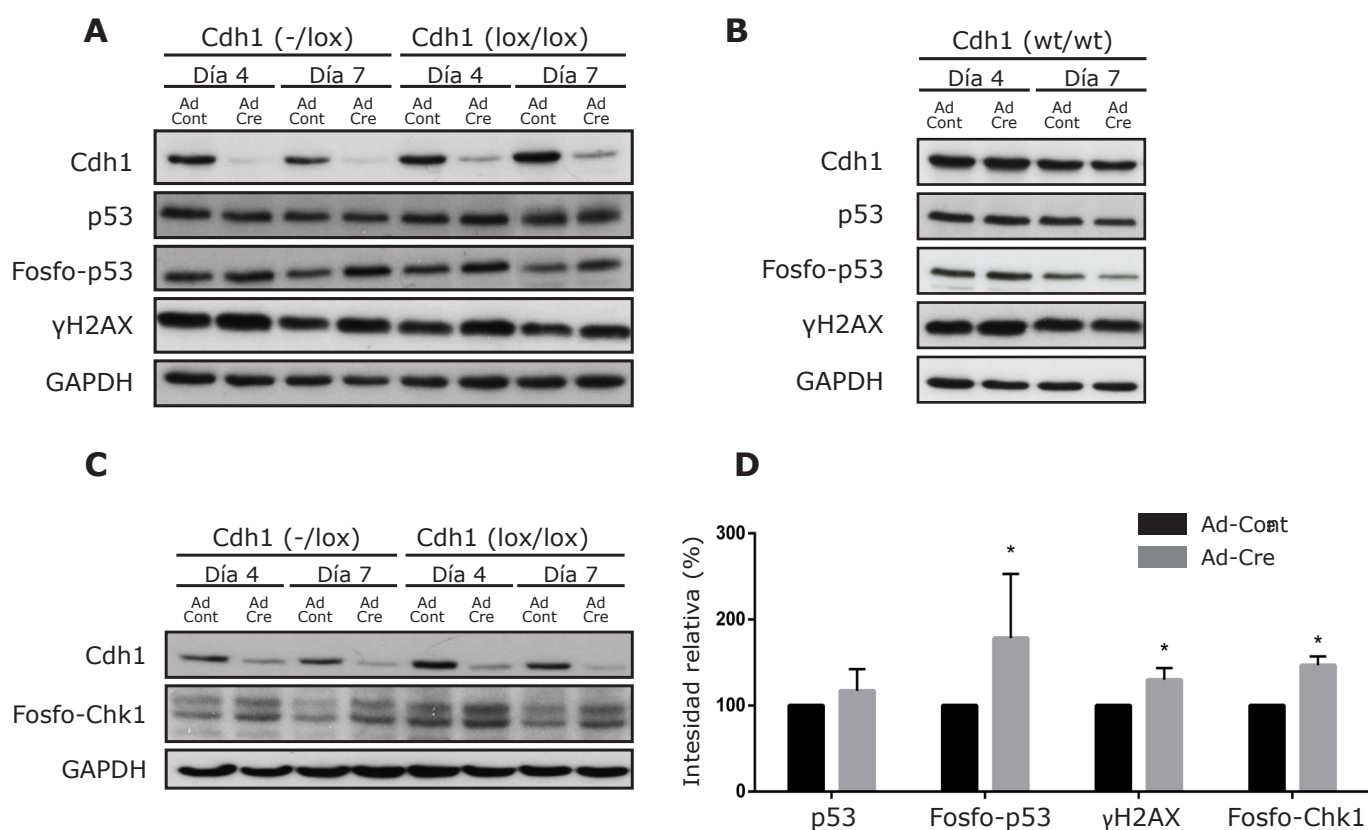
**Figura 9. (Página anterior). Monitorización de la aparición de daño en el primer ciclo de división en ausencia de Cdh1.** **A.** Partiendo del experimento detallado en la figura anterior se analizó por citometría de flujo el nivel de  $\gamma$ H2AX en función del contenido en DNA (7AAD), en las muestras recogidas a partir de las 20 horas tras la liberación del bloqueo en G0. Se seleccionaron únicamente aquellos MEFs que habían incorporado EdU, y que por tanto estaban o habían pasado por la primera fase S después de inducir la delección de Cdh1. Los paneles superiores corresponden a las muestras de los cultivos de MEFs silvestres mientras que los inferiores muestran los resultados obtenidos con los MEFs portadores del alelo condicional de Cdh1. En estos últimos se observa una acumulación de células positivas para  $\gamma$ H2AX con contenido en DNA 4N (G2/M, flechas negras) y un ligero retraso de estas células para completar la división celular y entrar en una nueva fase G1 (flecha roja). **B.** Cuantificación de la señal de  $\gamma$ H2AX en estos experimentos para las muestras de MEFs silvestres (azul, a la izquierda de la línea discontinua) y de MEFs Cdh1 (lox/lox) (rojo, a la derecha de la línea discontinua).

MEFs primarios deficientes en Cdh1 mostraron niveles más elevados de estas proteínas que los MEFs control (**Figura 10**). Lo mismo sucede en las células Cdh1 (lox/lox) infectadas con Adeno-Cre con respecto a las infectadas con adenovirus control (**Figura 11**). En cualquier caso, y como se puede comprobar, las diferencias son discretas. Hay que tener en cuenta que no estamos hablando de una agresión desmesurada sobre la integridad del DNA, como la que pudieran producir algunos compuestos genotóxicos, y que provocaría una activación mucho más intensa de la ruta de respuesta a daño (con parada de ciclo, apoptosis, etc.), sino que más bien se trataría de una moderada respuesta celular ante un daño endógeno de baja intensidad, pero que necesita ser controlado para evitar deterioros mayores.



**Figura 10. Activación moderada de la respuesta a daño en el DNA en ausencia de Cdh1.** **A.** Inmunodetección por Western Blot de las proteínas indicadas en lisados totales de MEFs control o deficientes en Cdh1. **B.** Representación gráfica del aumento relativo de los niveles de p53 y su forma fosforilada en MEFs deficientes en Cdh1 (n=3). Se tomó como valor de referencia la intensidad de la banda obtenida para cada proteína por Western Blot en las muestras procedentes de MEFs control. Previamente se normalizaron todos los valores con respecto a la intensidad del control de carga (GAPDH) correspondiente.

Los análisis por *Western Blot* confirmaron, por métodos independientes, un leve pero consistente aumento de los niveles de la forma fosforilada de H2AX, tras la depleción de Cdh1 (**Figura 11**). En cambio, el nivel total de la histona no se ve alterado en las mismas células (**Figura 12**). Lo mismo ocurre con el nivel total de Chk1 que no muestra variaciones tras la infección con Adeno-Cre. Esto confirma que la presencia incrementada de las formas fosforiladas se debe, efectivamente, a un aumento de la fosforilación como consecuencia de la activación de la respuesta celular a daño.



**Figura 11. Análisis bioquímico de la activación de la ruta de respuesta al daño tras la delección aguda de Cdh1 en MEFs primarios.** **A.** Inmunodetección por *Western Blot* de las proteínas indicadas en lisados totales de MEFs Cdh1 (-/lox) ó Cdh1 (lox/lox) infectados con Adeno-Cre (Ad-Cre) o con un adenovirus control (Ad-Cont) y recogidos 4 ó 8 días después de la infección. **B.** Análisis análogo al de A en MEFs silvestres (Cdh1 (wt/wt)) infectados con los mismos adenovirus. **C.** Análisis por *Western Blot* de los niveles de fosfo-Chk1, en muestras como las descritas en A. **D.** Representación gráfica de los niveles relativos de las proteínas indicadas en MEFs portadores del alelo condicional de Cdh1 infectados con adenovirus control (Ad-Cont) o con Adeno-Cre (Ad-Cre) (n=6). En cada caso se tomó como valor de referencia el dato correspondiente a la muestra control y todos los valores se normalizaron con respecto al control de carga (GAPDH). Los datos de los dos tiempos de recogida de las células (días 4 y 7) se agruparon en una sola categoría. (\*p<0,05).

### 1.5. Los MEFs deficientes en Cdh1 muestran una mayor sensibilidad a determinados compuestos genotóxicos que interfieren con la replicación

Dado que los MEFs carentes o deplecionados de Cdh1 muestran un nivel basal de daño endógeno superior a los MEFs control, nos planteamos que la exposición a compuestos genotóxicos podría resultarles más nociva que a estos últimos. Para comprobarlo, llevamos a cabo ensayos de sensibilidad a determinados compuestos que interfieren de una manera más selectiva sobre la replicación del DNA, como son la hidroxiurea (inhibidor de la síntesis de dNTPs), o la mitomicina-C (que induce entrecruzamientos intercatenarios).

Se seleccionaron distintas parejas de MEFs primarios control y *knockout* para Cdh1 y se cultivaron durante varios días en presencia de concentraciones crecientes de las distintas drogas, tras lo cual se realizó un ensayo colorimétrico basado en la detección de actividad mitocondrial (ensayo MTT), para valorar el número de células viables presentes en cada cultivo

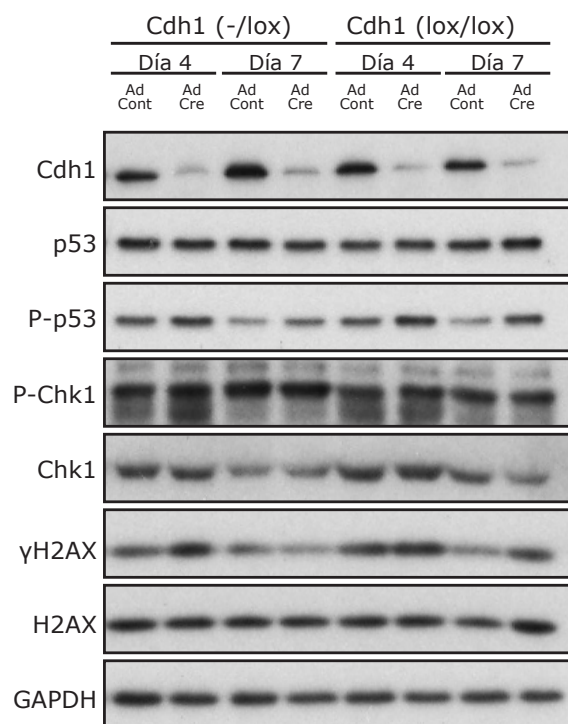


## Resultados

al finalizar el tratamiento. Como se observa en las gráficas de la **Figura 13**, resultado de la compilación de datos de varios experimentos independientes, las células carentes de Cdh1 mostraron una sensibilidad moderadamente incrementada a mitomicina C (MMC) y a concentraciones intermedias de hidroxurea (HU). El cálculo de la IC50 (concentración de compuesto necesaria para inhibir la viabilidad de la población celular en un 50%) ratificó las afirmaciones anteriores (valores incluidos en la **Fig. 13**). Es importante tener en cuenta que las drogas podrían estar afectando tanto a la viabilidad de las células como a su capacidad de proliferar, y que por tanto, el cómputo de células al finalizar el tratamiento, dependerá de ambos efectos.

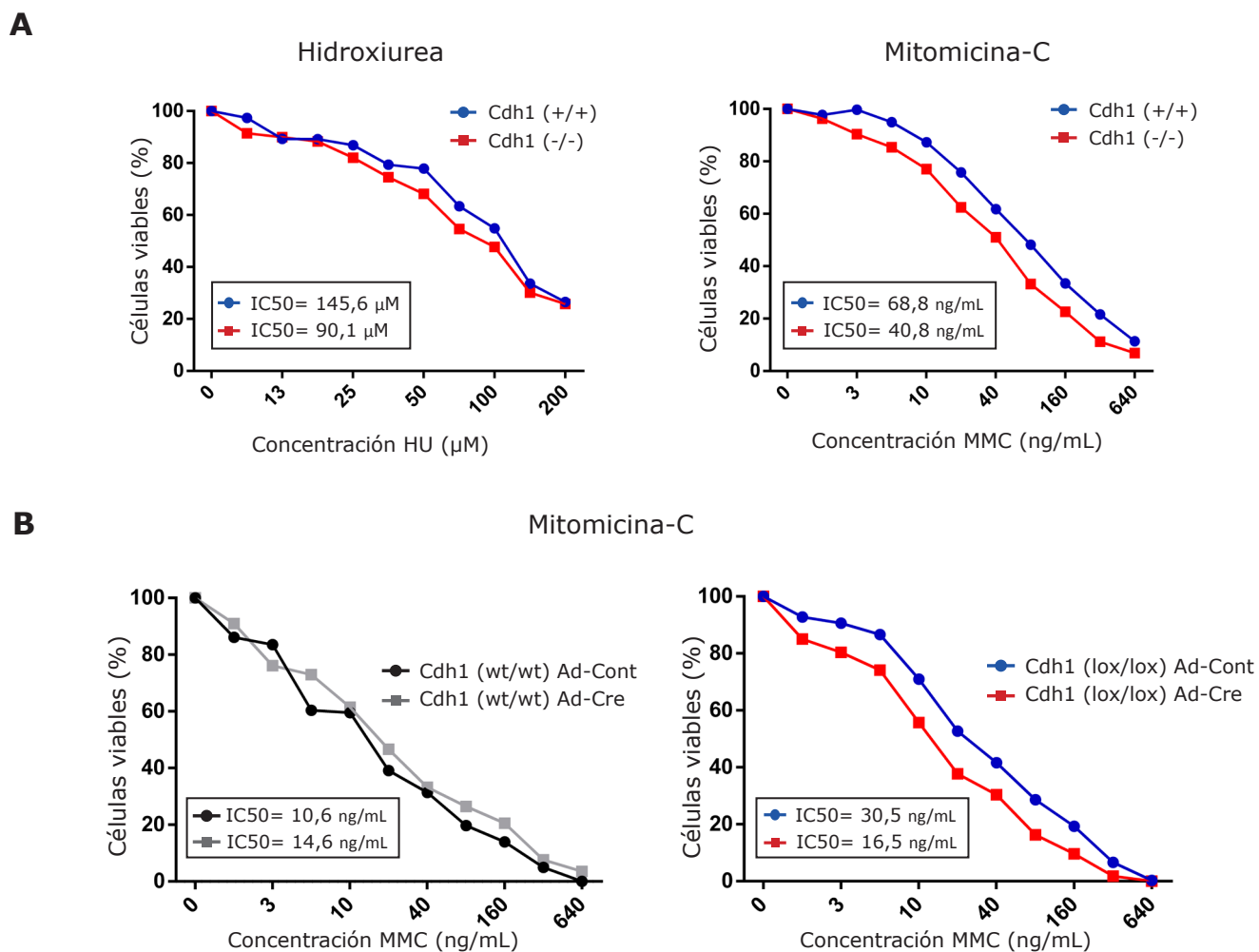
Más adelante, y puesto que fueron los tratamientos con MMC los que produjeron diferencias más claras entre las células control y mutantes, decidimos repetir los ensayos con este compuesto tras inducir de manera aguda la escisión de Cdh1 con Adeno-Cre. Nuevamente, las células deplecionadas del cofactor de APC/C mostraron una sensibilidad discretamente superior a este compuesto (**Figura 13B**). Sin embargo, como cabría esperar, los mismos adenovirus no modificaron la sensibilidad a la droga de MEFs silvestres, confirmando que el efecto observado tras la infección de los MEFs Cdh1 (lox/lox) con Adeno-Cre se debía, efectivamente, a la depleción de Cdh1 y no a la expresión de la recombinasa.

Los datos indican, por tanto, que en ausencia de Cdh1 se incrementa ligeramente la sensibilidad de las células a MMC y, en menor medida, a HU, sustancias ambas que dificultan el proceso de replicación y que, presumiblemente, amplificarán el daño pre-existente en estas células. No podemos descartar, sin embargo, que la falta de Cdh1 también comprometa en cierta medida la capacidad de reparación de las lesiones producidas por dichos compuestos.



**Figura 12. Los niveles de Chk1 y de la histona H2AX no varían tras la delección aguda de Cdh1.** Inmunodetección por Western Blot de las proteínas indicadas o de sus formas fosforiladas en lisados totales de MEFs portadores del alelo condicional de Cdh1, infectados con Adeno-Cre (Ad-Cre) o con un adenovirus control (Ad-Cont), y recogidos a los 4 ó 7 días de la infección. Como control de carga se determinó la expresión de GAPDH.





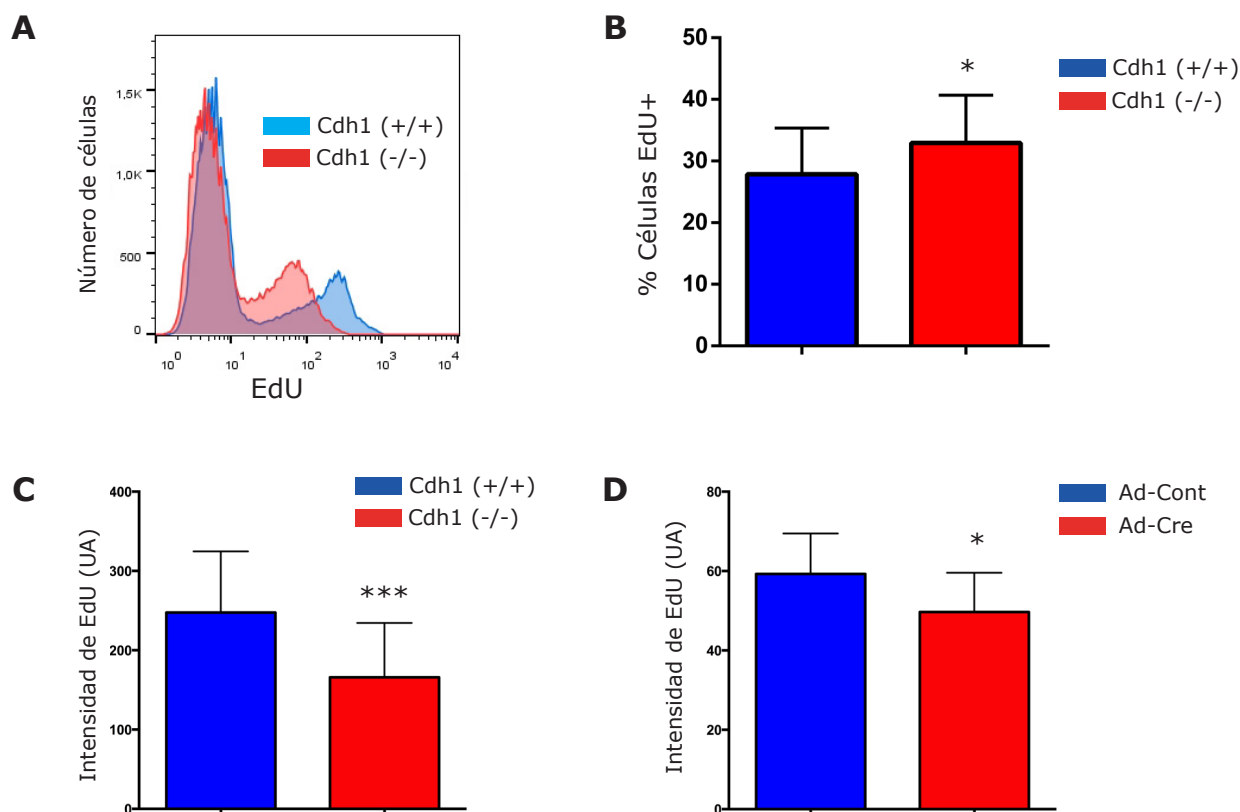
**Figura 13. Ensayos de sensibilidad a drogas que interfieren con la replicación. A.** Se trataron cultivos de MEFs control (Cdh1 (+/+)) o deficientes en Cdh1 (Cdh1 (-/-)) con concentraciones crecientes de los compuestos indicados durante 4-5 días, tras los cuales se cuantificaron las células viables mediante un ensayo colorimétrico. Las gráficas muestran, para cada muestra y condición, el porcentaje de células viables con respecto a la muestra que creció en ausencia de droga (100% de células viables). Se incluye en un recuadro el valor promedio de la concentración de compuesto necesaria para reducir la viabilidad de las células en un 50 % (IC50) ( $n \geq 3$ ). **B.** Se procedió de la misma manera que en A pero con MEFs silvestres (Cdh1(wt/wt)) o Cdh1 (lox/lox) infectados con Adeno-cre (Ad-Cre) o con un adenovirus control (Ad-Cont) e incubados con Mitomomicina-C a partir del tercer día después de la infección. De nuevo se incluye en un recuadro el valor del IC50 para cada muestra.

## 2. La ausencia de Cdh1 provoca estrés replicativo

Los resultados obtenidos en la caracterización inicial de los MEFs carentes y deplecionados de Cdh1 sugerían que la acumulación de daño endógeno observado en estas células podría ser consecuencia de alteraciones en el proceso de replicación que produjeran estrés replicativo. Para poder ratificar nuestra hipótesis nos planteamos estudiar en mayor detalle la eficiencia de la replicación, la dinámica de replicación a nivel de las horquillas, la duración global de la fase S y la eficiencia en el licenciamiento de orígenes.

## 2.1. APC/C-Cdh1 contribuye a garantizar una replicación eficiente

Como ya se ha demostrado previamente, la ausencia de Cdh1 produce un incremento de la actividad Cdk en G1 y una entrada prematura de la célula en la fase S (García-Higuera *et al.*, 2008; Sigl *et al.*, 2009). Para poder determinar si, además del adelanto en el momento de inicio de la fase S, la eficiencia de la replicación también se veía afectada en ausencia de Cdh1, realizamos marcajes breves (1-2 horas) de MEFs primarios control y deficientes en Cdh1 con el análogo de timidina EdU, para posteriormente analizar su incorporación por citometría de flujo. Comprobamos en primer lugar que el porcentaje de células replicando era moderadamente superior en los cultivos de MEFs mutantes (**Fig. 14B**), sugiriendo que posiblemente la replicación era más lenta en estas células. Pero además, constatamos que la intensidad de la señal del EdU incorporado al DNA en las células carentes de Cdh1 era más baja (**Fig. 14C**), indicando que en el mismo periodo de tiempo estas células habían incorporado menos moléculas del análogo de timidina. Resultados similares se obtuvieron al realizar el mismo análisis con MEFs portadores del alelo condicional de Cdh1 e infectados con Adeno-Cre (**Figura 14D**). Estos datos sugerían que la eficiencia de la replicación se ve comprometida cuando



**Figura 14. La eficiencia de la replicación se ve comprometida en ausencia de Cdh1.** **A.** Perfil de incorporación de EdU analizado por citometría de flujo en una pareja representativa de MEFs Cdh1 (+/+) y Cdh1 (-/-), procedentes de la misma camada de embriones, incubados en presencia de EdU 10  $\mu$ M durante 2 h antes de ser recogidos. **B.** Porcentaje promedio de células en fase S en cultivos asíncronos de MEFs control (azul) o deficientes en Cdh1 (rojo). Se cuantificó por citometría de flujo el porcentaje de células positivas para EdU tras 2 h de marcaje con el análogo de timidina (n=20). **C.** Cuantificación de la intensidad de fluorescencia del EdU incorporado en cultivos de MEFs primarios control (azul) y deficientes en Cdh1 (rojo) (n=20). Las muestras procesadas en el citómetro fueron analizadas con el *software* FlowJo, calculando la intensidad de fluorescencia media (unidades arbitrarias) de la población EdU+. **D.** Cuantificación de la intensidad de fluorescencia del EdU incorporado en cultivos de MEFs Cdh1 (lox/lox) infectados con Adeno-Cre (rojo) o con un adenovirus control (azul) (n=10). (\*p<0,05; \*\*\*p<0,001).

no está presente Cdh1 y planteaban la necesidad de estudiar en mayor detalle el proceso de síntesis de DNA en células carentes del cofactor de APC/C.

## **2.2. La pérdida de Cdh1 disminuye la velocidad de progresión de las horquillas de replicación y reduce la distancia entre orígenes de replicación adyacentes**

Para comprender mejor el papel de Cdh1 en la dinámica normal de replicación decidimos llevar a cabo ensayos de fibras de DNA, en colaboración con el grupo del Dr. Juan Méndez (Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas, Madrid). Esta técnica consiste en analizar fibras individuales de DNA extendidas sobre un portaobjetos y procedentes de células marcadas previamente con dos pulsos consecutivos de CldU e IdU (dos análogos de timidina). De este modo, utilizando anticuerpos específicos para cada uno de los análogos en ensayos de inmuofluorescencia, es posible visualizar la incorporación de los análogos y determinar tanto la velocidad de síntesis del DNA en cada horquilla replicativa como la distancia entre orígenes de replicación contiguos (IOD) (ver imágenes representativas en la **Figura 15A**).

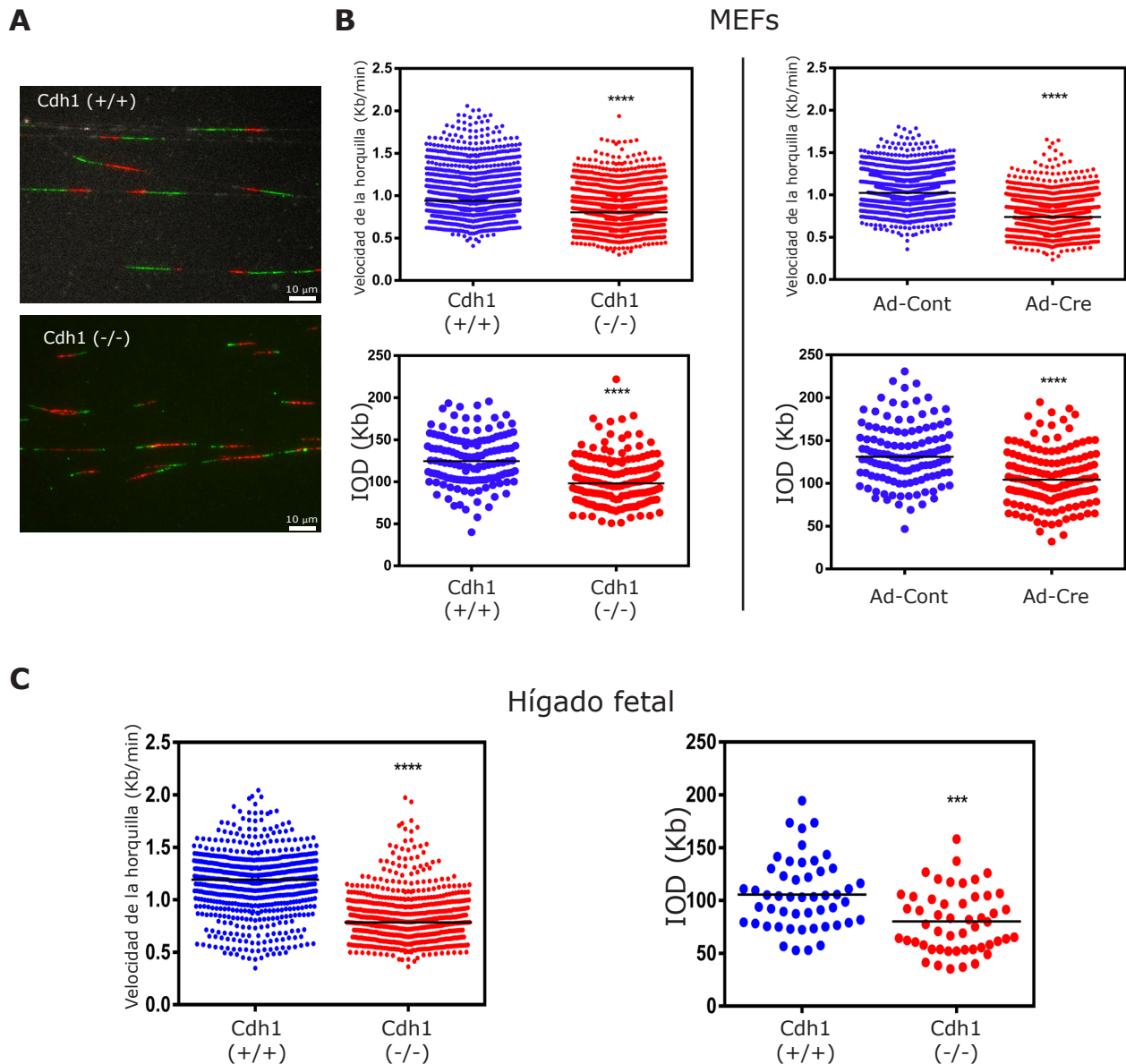
Realizando este tipo de ensayos comprobamos que tanto en los MEFs deficientes en Cdh1 como en los deplecionados de Cdh1, la longitud de los segmentos de DNA que habían incorporado IdU era menor que en los correspondientes cultivos control, indicando que en ausencia de Cdh1 las horquillas replicativas avanzan más lentamente (**Fig. 15A**). Por otra parte, el análisis de la distancia entre orígenes reveló una menor distancia media entre orígenes contiguos en el caso de los MEFs mutantes, sugiriendo una mayor frecuencia de disparo de orígenes en ausencia del cofactor de APC/C. Cabe destacar que en ambos casos las diferencias entre células control y mutantes resultaron ser altamente significativas. Para confirmar estas alteraciones en la dinámica de replicación en otro tipo celular diferente a los fibroblastos embrionarios, aislamos células del hígado fetal de embriones control y deficientes en Cdh1 a los 14,5 días de gestación, efectuando igualmente ensayos de fibras de DNA (**Fig. 15B**). En estas células, fundamentalmente precursores eritroides con una elevada tasa de proliferación, los datos obtenidos corroboraron lo ya observado en MEFs, es decir, tanto la velocidad de la horquilla como la distancia entre orígenes resultaron significativamente menores en las células eritroides obtenidas de embriones constitutivamente deficientes en Cdh1 con respecto a las extraídas de embriones control.

Para averiguar si, además de una progresión más lenta de las horquillas replicativas, se estaba produciendo una mayor incidencia de horquillas paradas o colapsadas, se analizó la simetría de las dos horquillas nacidas a partir de un mismo origen y avanzando en sentidos opuestos. Está comprobado que cuanto mayor es la frecuencia de parada de horquillas, mayor es la probabilidad de que las cadenas nacidas del mismo origen tengan longitudes distintas, y por

## Resultados

tanto, mayor la asimetría. Así pues, se cuantificaron los orígenes asimétricos presentes en muestras de MEFs deficientes en Cdh1 o deplecionados del cofactor de APC/C mediante infección con Adeno-Cre (**Fig. 16**), y en ambos casos se obtuvieron valores significativamente superiores a los de los correspondientes MEFs control, evidenciando una mayor incidencia de horquillas detenidas o colapsadas en ausencia de Cdh1.

Estos datos nos permiten concluir sin ningún género de dudas, que la ausencia de Cdh1 induce



**Figura 15. Alteraciones en la dinámica de replicación en ausencia de Cdh1.** **A.** Imágenes representativas de fibras de DNA procedentes de MEFs control (panel superior) o deficientes en Cdh1 (panel inferior) teñidas con anticuerpos contra CldU (rojo) e IdU (verde) para visualizar la incorporación de los análogos. **B.** Mediante ensayos de fibras de DNA se consiguió determinar la velocidad de progresión de las horquillas (paneles superiores) así como la distancia entre orígenes de replicación adyacentes (IOD, paneles inferiores) tanto en MEFs control (azul) y deficientes en Cdh1 (rojo) (paneles izquierda), como en MEFs Cdh1 (lox/lox) infectados con Adeno-Cre (rojo) o con un adenovirus control (azul) y recogidos a los 3-4 días de la infección (paneles derecha). En ambos casos se muestra el compendio de datos obtenidos en 3 ensayos independientes. **C.** Se procedió al análisis de los mismos parámetros replicativos en células de hígado fetal de embriones control (azul) o deficientes en Cdh1 (rojo) de 14,5 días. Los datos mostrados proceden de dos ensayos independientes realizados con muestras de dos parejas de embriones de la misma camada. (\*\*p<0,001; \*\*\*\*p<0,0001).

	Velocidad de la horquilla (Kb/min) +/- SD	Distancia entre orígenes (Kb) +/- SD
<b>Cdh1 (+/+) MEFs</b>	<b>0.939</b> +/- 0.282	<b>124.5</b> +/- 30.3
<b>Cdh1 (-/-) MEFs</b>	<b>0.803</b> +/- 0.235	<b>98.1</b> +/- 29.5
<b>Cdh1 (+/+) Hígado fetal</b>	<b>1.191</b> +/- 0.307	<b>103.4</b> +/- 32.9
<b>Cdh1 (-/-) Hígado fetal</b>	<b>0.785</b> +/- 0.253	<b>77.6</b> +/- 29.0
<b>Ad-Cont MEFs</b>	<b>1.024</b> +/- 0.209	<b>130.9</b> +/- 35.3
<b>Ad-Cre MEFs</b>	<b>0.739</b> +/- 0.195	<b>104.4</b> +/- 32.8

**Tabla 1.** Valores de la velocidad de progresión de las horquillas de replicación y de la distancia entre orígenes en MEFs y células eritroides control y mutantes para Cdh1 y en MEFs Cdh1 (lox/lox) infectados con Ad-Cont y Ad-Cre. Al tratarse de poblaciones de datos que no siguen una distribución normal el valor incluido en la tabla es el de la mediana, junto con la correspondiente desviación estándar para cada condición.

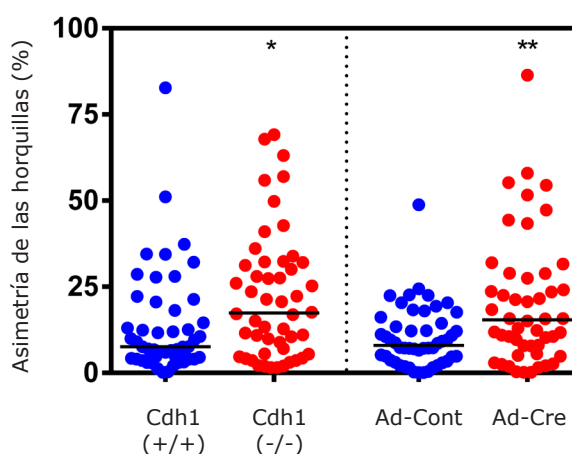
estrés replicativo. O, dicho de otro modo, que la actividad del complejo APC/C-Cdh1 previene el estrés replicativo.

### 2.3. La ralentización de las horquillas replicativas en ausencia de Cdh1 no es consecuencia del aumento de orígenes activados

A la vista de los resultados expuestos en la sección anterior, nos asaltó la duda de si las alteraciones detectadas en los dos parámetros replicativos representarían realmente defectos independientes, o si, por el contrario, y como parecía más probable, estaban relacionados entre sí.

Uno de los efectos derivados de una activación de orígenes incrementada es la disminución generalizada de la velocidad de

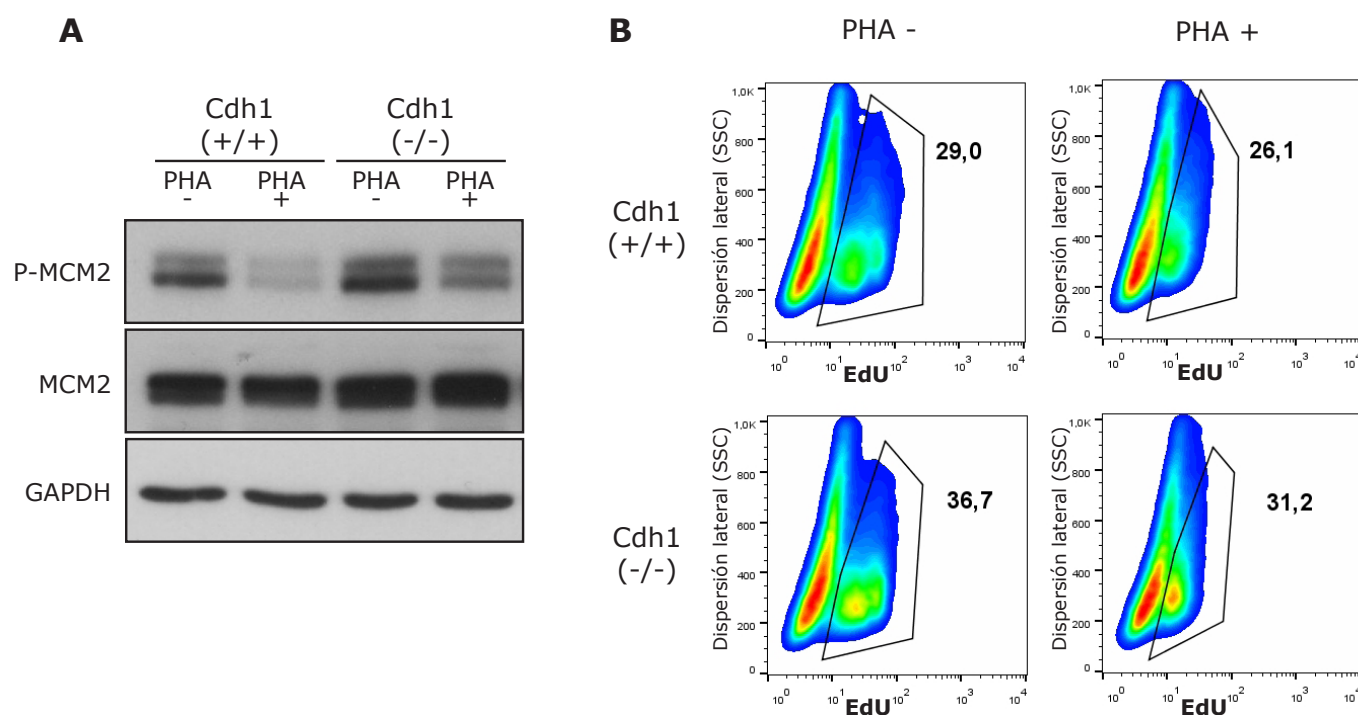
$$\text{Asimetría (\%)} = \frac{(\text{Segmento largo} / \text{segmento corto} - 1) \times 100}{\text{Ori}}$$



**Figura 16. La ausencia de Cdh1 genera una mayor asimetría de las horquillas de replicación.** A partir de las preparaciones de fibras de DNA, se calculó el porcentaje de asimetría de las horquillas nacidas del mismo origen tal y como se indica en el esquema de la parte superior. En el panel inferior aparecen representados los datos obtenidos con MEFs control (azul) y deficientes en Cdh1 (rojo) (a la izquierda de la línea discontinua) o con MEFs Cdh1 (lox/lox) infectados con Adeno-Cre (rojo) o con un adenovirus control (azul) (a la derecha de la línea discontinua). (\*p<0,05; \*\*p<0,01).

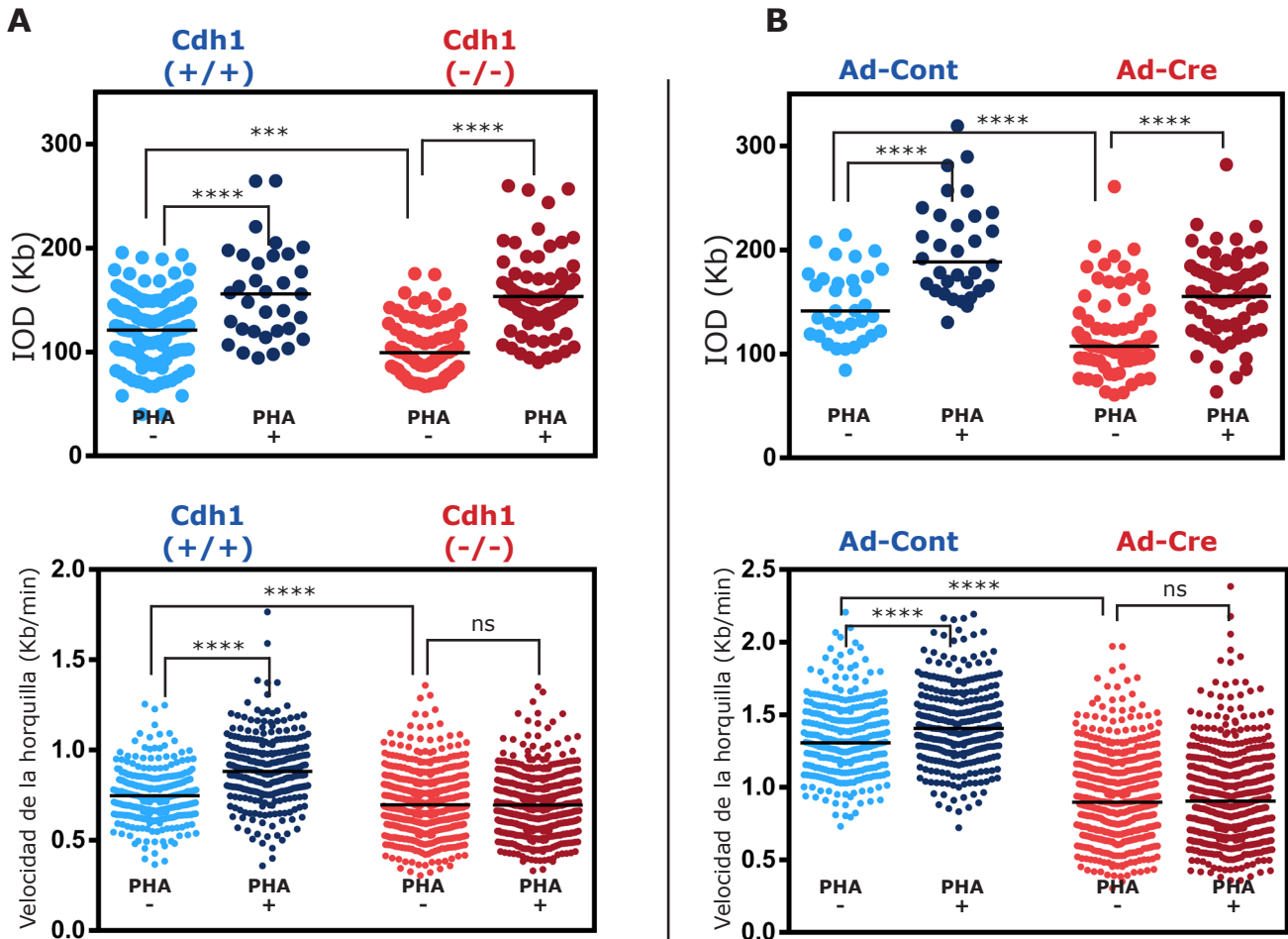
## Resultados

progresión de las horquillas (Petermann *et al.*, 2010; Bester *et al.*, 2011; Zhong *et al.*, 2013). Quisimos, por tanto, determinar si en nuestro caso ocurría algo similar. Para ello, decidimos inhibir parcialmente y de manera artificial el disparo de orígenes, y examinar el efecto sobre la velocidad de síntesis del DNA en MEFs control y mutantes. Así, utilizamos PHA-767491 (PHA), un compuesto químico capaz de inhibir la actividad quinasa de Cdc7 sobre el complejo MCM, responsable de la activación del replisoma. Para verificar que, efectivamente, el tratamiento aplicado inhibía dicha actividad quinasa, utilizamos un anticuerpo fosfo-específico para detectar por Western Blot la forma fosforilada de MCM2 (fosforilación en el residuo Ser53), y observamos una notable disminución de la fosfoproteína en las células tratadas con el inhibidor (**Fig. 17A**). También se comprobó por citometría que la dosis añadida de PHA no inhibía la síntesis de DNA, sino únicamente el disparo de nuevos orígenes y que alteraba en la menor medida posible el porcentaje de células en fase replicativa (**Fig. 17B**). Esto último resultaba esencial para poder analizar sin problemas la incorporación del CldU e IdU en los ensayos de fibras. Examinamos por tanto la dinámica de replicación después de tratar los MEFs durante 4 horas con PHA (**Figura 18**). En todos los casos (MEFs control y *knockout* para Cdh1, y MEFs Cdh1 (lox/lox) infectados con Adeno-Cre o con un adenovirus control), se produjo un aumento de la distancia media entre orígenes contiguos en las células tratadas con el inhibidor con respecto a las no tratadas, confirmando la reducción en la activación de nuevos orígenes. Sin embargo, mientras que en los MEFs control (Cdh1 (+/+)) y Cdh1 (lox/lox) + Ad-Cont) se produjo



**Figura 17. Verificación de la inhibición química ejercida por PHA-767491 sobre la actividad quinasa de Cdc7. A.** Immunodetección por *Western Blot* de MCM2 y de su forma fosforilada (Ser53) en lisados totales de MEFs control o deficientes en Cdh1 tratados con el inhibidor de Cdc7 PHA-767491, a una concentración de 20  $\mu$ M durante 4 h. **B.** Valoración de la incorporación de EdU por citometría de flujo en cultivos control o deficientes en Cdh1 tratados igual que en A e incubados en presencia de EdU 10  $\mu$ M 2 horas antes de recogerlos y fijarlos.





**Figura 18. Los defectos en la velocidad de progresión de las horquillas de las células carentes o deplecionadas en Cdh1 no tienen su origen en el exceso de activación de orígenes.** A. Resultados de los ensayos de fibras de DNA realizados con MEFs control (azul) o deficientes en Cdh1 (rojo) sin tratar (PHA -) o tratados con PHA-767491 (PHA +). Se analizó tanto la distancia entre orígenes contiguos (IOD, panel superior) como la velocidad de las horquillas replicativas (panel inferior) B. Se procedió de la misma forma que en A, pero con MEFs Cdh1 (lox/lox) infectados con Adeno-cre (rojo) o con un adenovirus control (azul) y tratados o no con PHA a los 3-4 días de la infección. En ambos casos se muestran los datos compendiados de al menos dos experimentos independientes. (\*\*\*) $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ ).

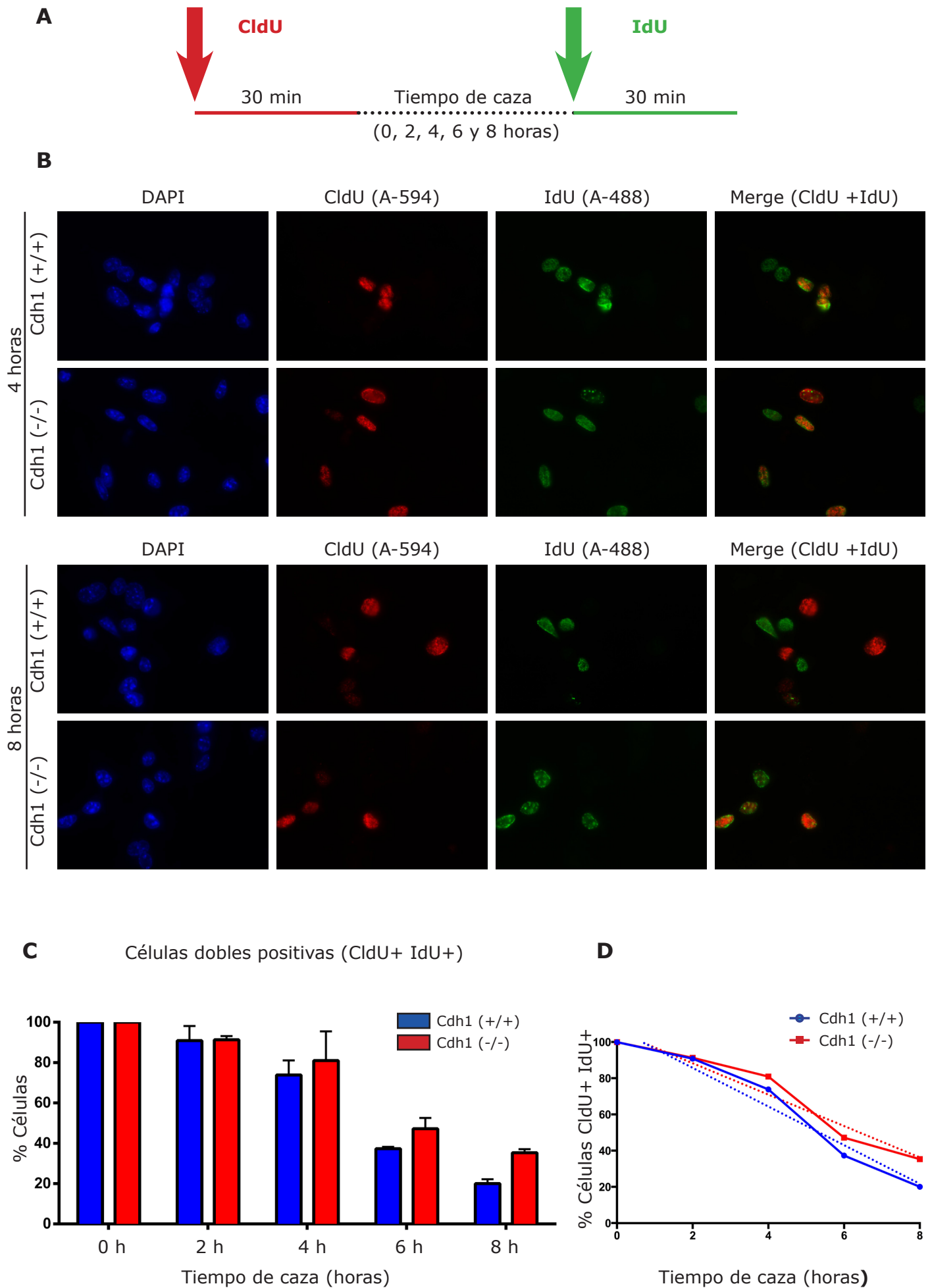
un notable aumento de la velocidad de progresión de las horquillas para compensar por la pérdida de orígenes activos, en el caso de los MEFs mutantes (Cdh1 (-/-) y Cdh1 (lox/lox) + Ad-Cre) el avance de las horquillas siguió siendo igual de lento en las células tratadas con PHA que en las no tratadas. Es decir, que a pesar de contar con menos orígenes activos estas células no son capaces de aumentar la velocidad de síntesis del DNA para compensar. Esto nos permitió concluir que el hecho de que las horquillas replicativas viajaran más despacio en ausencia de Cdh1 no era consecuencia del incremento en la activación de orígenes, sino que se trataba más bien de un defecto independiente y primario. Y no solo eso, sino que como ya se ha descrito en otros trabajos (Anglana *et al.*, 2003; Ge *et al.*, 2007; Ibarra *et al.*, 2008), lo más probable es que se estuviera produciendo la situación inversa, es decir, que los defectos en el avance del replisoma estuvieran fomentando la activación de orígenes durmientes para intentar completar de manera eficiente la replicación íntegra del genoma.

### 2.4. Las células que carecen de Cdh1 evidencian una fase S más prolongada

Dado que en los MEFs carentes o deplecionados de Cdh1 se estaban disparando más orígenes de replicación que en los MEFs control, quisimos averiguar si ese exceso de orígenes activos era capaz de compensar la ralentización de las horquillas y permitía a la célula mutante completar la duplicación del genoma en el mismo tiempo que una célula control. Nuestros datos previos referidos a la incorporación de EdU (**Figura 14**) sugerían que no era así, y que globalmente la síntesis de DNA era más ineficiente en ausencia de Cdh1. Para demostrarlo decidimos comparar la duración de la fase replicativa en MEFs primarios control y deficientes en Cdh1, realizando experimentos de doble marcaje con los análogos de la timidina CldU e IdU. Para ello, cultivos asíncronos de MEFs de los genotipos relevantes se sometieron a un pulso de 30 minutos con el primer análogo, seguido de un periodo de caza variable (de entre 0 y 8 horas), transcurrido el cual se aplicó un segundo pulso con el otro análogo. Finalizado este pulso, se fijaron las células y se procesaron para visualizar por microscopía de fluorescencia, y con ayuda de anticuerpos específicos, la incorporación de ambos análogos. Para cada tiempo de caza se cuantificaron las células positivas para ambos análogos al final del segundo pulso, que representan las células que aún estaban replicando su DNA trascurrido ese periodo. Así, se pudo comprobar que a medida que aumentaba el tiempo de caza, aumentaba también la diferencia en el porcentaje de células positivas para ambos análogos, siendo mayor en las muestras de MEFs mutantes que en los controles (**Fig. 19C**). Es decir, que a partir de las 4 horas desde el marcaje con el primer análogo, un mayor número de MEFs deficientes en Cdh1 continuaban replicando su DNA; y a las 8 horas ese número era casi el doble que el de los cultivos de MEFs control (**Fig. 19C**). Para tratar de estimar la duración aproximada de la fase S en ambos genotipos, se estableció una correlación lineal entre el porcentaje de células dobles positivas y el tiempo de caza (**Fig. 19D**). En el caso de los MEFs control se obtuvo un valor de duración de fase S de 10,03 horas, mientras que para los MEFs deficientes en Cdh1 la duración estimada de la fase S fue de 12,18 horas. Concluimos por tanto que la ralentización de las horquillas ante la pérdida de Cdh1 repercute en la duración global de la fase replicativa, que resulta un 20% más larga en MEFs carentes de Cdh1.

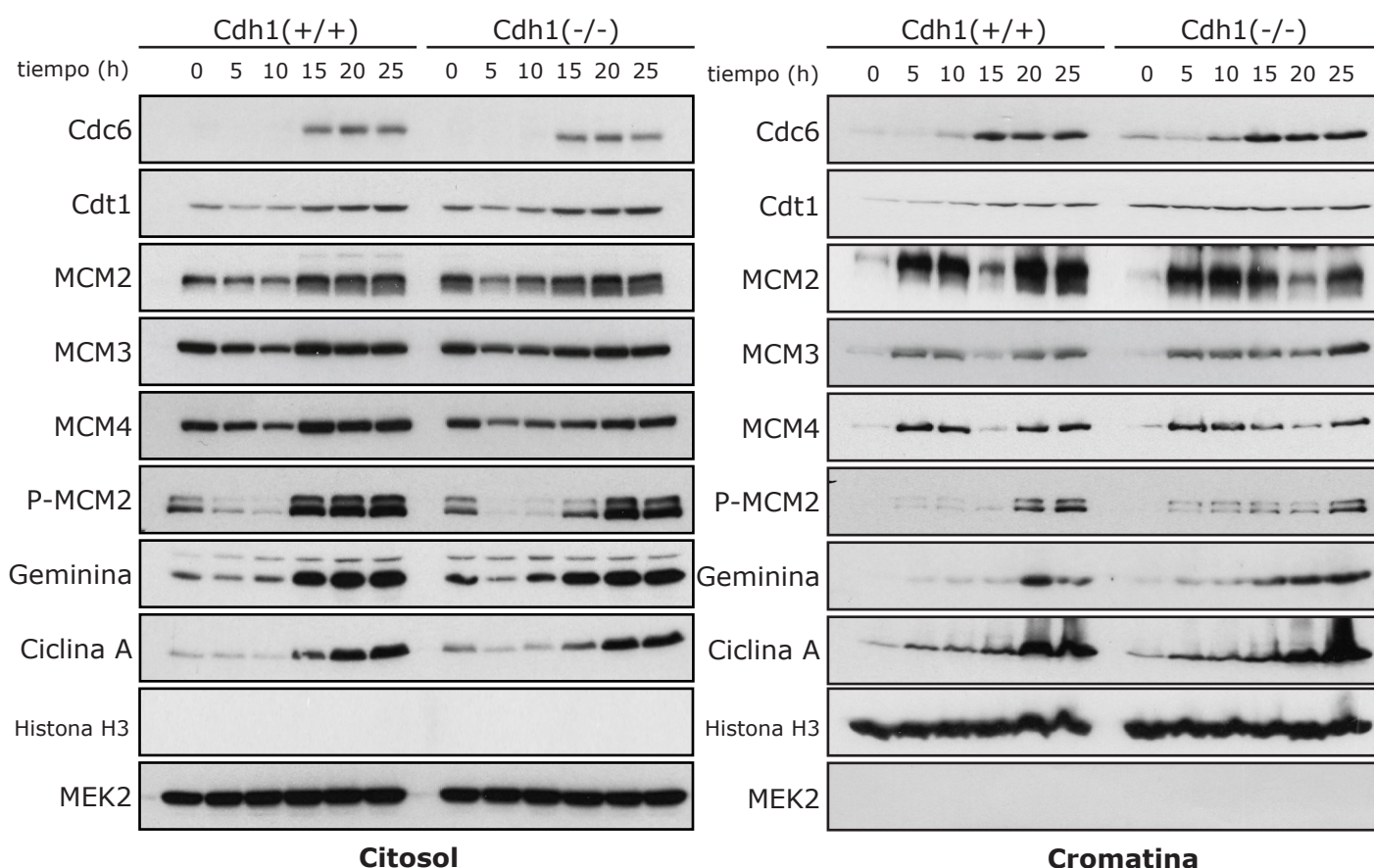
**Figura 19. (Página siguiente). La ausencia de Cdh1 produce una extensión de la fase S. A.** Esquema del diseño experimental de los ensayos de pulso-caza-pulso con los dos análogos de timidina CldU e IdU. Se aplicaron dos pulsos de 30 minutos con cada análogo separados por un periodo de caza variable (de entre 0 y 8 horas). **B.** Imágenes representativas de la detección por microscopía de fluorescencia de células positivas para CldU (rojo) y/o IdU (verde) en cultivos de MEFs control y deficientes en Cdh1 sometidos a dos tiempos de caza diferentes (4 y 8 horas). **C.** Cuantificación del porcentaje de células dobles positivas para CldU e IdU con respecto al total de células positivas para CldU tras los tiempos de caza indicados en cultivos de MEFs control (azul) o deficientes en Cdh1 (rojo). **D.** Representando los valores referidos en C. para los MEFs control (línea azul) o deficientes en Cdh1 (línea roja) pudimos obtener una línea de tendencia (línea discontinua en la gráfica) que nos permitió estimar la duración global de la fase S en los dos tipos de MEFs.





## 2.5. La carga cromatínica de los complejos pre-replicativos no se ve disminuida en ausencia de Cdh1

Puesto que está sobradamente establecido que el licenciamento de orígenes requiere un periodo de baja actividad Cdk en la última fase de la mitosis y durante G1 (Masai *et al.*, 2010; Diffley, 2011), y se asume que ese control de la actividad Cdk es ejercido fundamentalmente por el complejo APC/C-Cdh1, es razonable pensar que la carga de los complejos pre-replicativos pudiera estar disminuida en ausencia de Cdh1. Los datos obtenidos con los ensayos de fibras no parecen apoyar esta idea, puesto que el disparo de orígenes está incrementado en MEFs mutantes. Sin embargo, podría ocurrir que aun habiendo un deficit de orígenes licenciados se activasen más orígenes que en células control (como consecuencia, por ejemplo de la estabilización de Dbf4, o simplemente para compensar por la ralentización de las horquillas). Para determinar los niveles en cromatina de las distintas proteínas que participan en el licenciamento de orígenes se realizaron fraccionamientos subcelulares de los distintos MEFs con objeto de obtener una fracción cromatínica y una fracción citosólica (Méndez y Stillman,



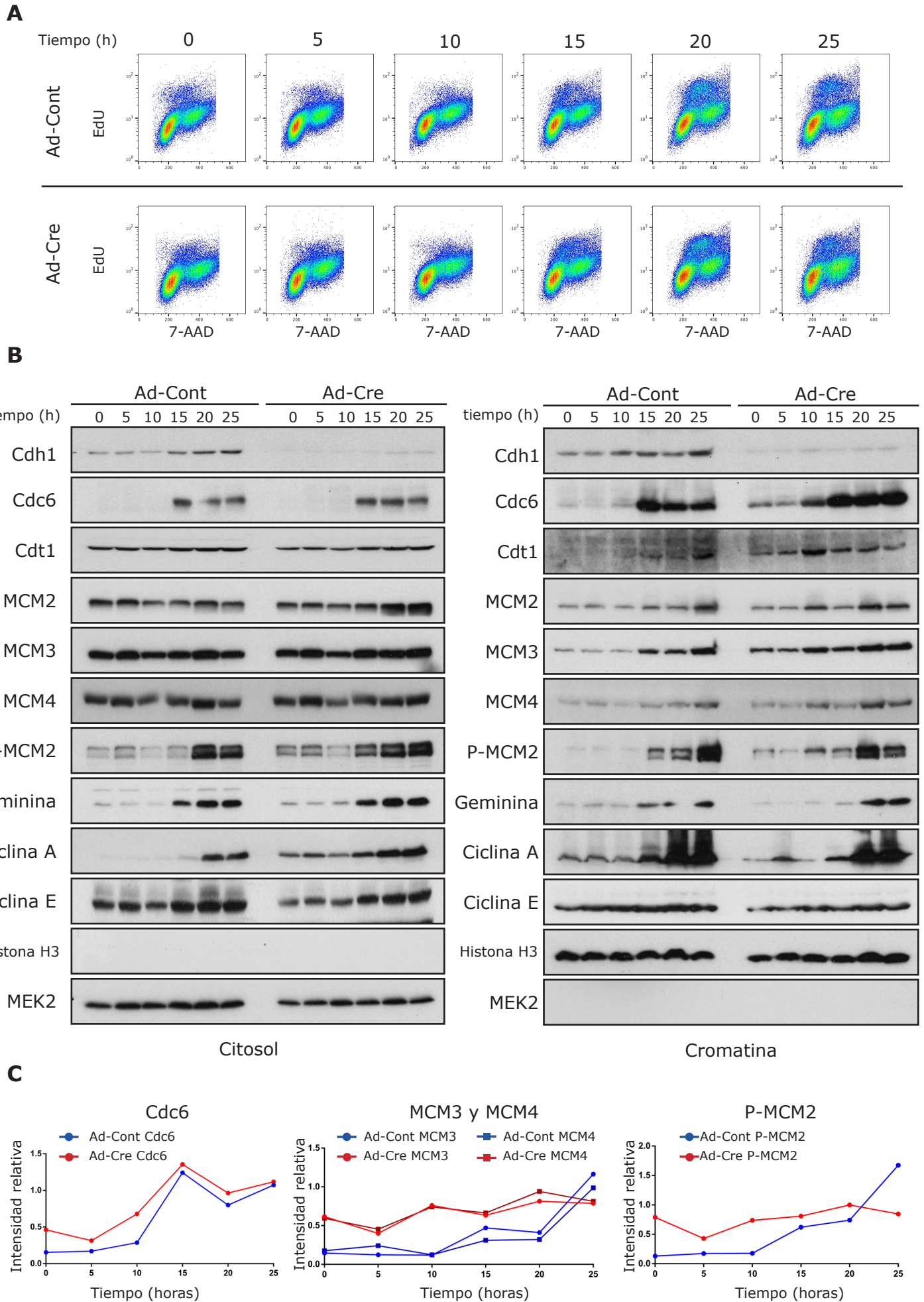
**Figura 20. Análisis de la cinética de carga en cromatina de factores implicados en el licenciamento y activación de orígenes en células control y deficientes en Cdh1.** MEFs del genotipo indicado se sincronizaron en G0 (72h en 0,5% FBS) y tras inducir su reentrada en ciclo por adición de suero al medio de cultivo, se recogieron muestras a los tiempos indicados (0 -25 horas). Se procedió al fraccionamiento subcelular de cada muestra para separar las proteínas citosólicas y las unidas a cromatina y finalmente se analizaron por *Western Blot* los niveles de las proteínas de interés en ambos compartimentos. Para confirmar la eficacia del fraccionamiento se valoró también la presencia de la quinasa MEK2 (control citosol) y de la Histona H3 (control cromatina). Los paneles de la izquierda muestran el resultado de la inmunodetección de las proteínas indicadas en la fracción citosólica, mientras que los paneles de la derecha corresponden a las muestras de la fracción cromatínica.

2000). Para ello, decidimos analizar la cinética de carga en cromatina de los componentes del complejo pre-replicative en cultivos sincronizados. Así, cultivos primarios de MEFs de los genotipos relevantes fueron sincronizados en G0 por eliminación del suero en el medio de cultivo, y tras estimular su re-entrada en ciclo, se recogieron a distintos tiempos, se obtuvieron las fracciones subcelulares correspondientes y se valoraron por *Western Blot* y utilizando anticuerpos específicos los niveles en citosol y cromatina de los distintos factores que participan en el ensamblaje de los complejos pre-replicative (Cdc6, Cdt1 y subunidades de la helicasa MCM), así como de otras proteínas importantes en la transición G1-S (geminina, ciclinas A y E) (**Figuras 20 y 21**). En primer lugar utilizamos para nuestro ensayo MEFs primarios Cdh1 (+/+) y Cdh1 (-/-), detectando una carga en cromatina incrementada para Cdc6 y Cdt1 (aunque también para otras proteínas en menor medida), en las muestras correspondientes al tiempo 0 horas, es decir, en los cultivos no liberados del bloqueo en G0.

Esta misma observación (incremento de Cdc6, Cdt1 y algunas de las subunidades de MCM en la fracción cromatínica) fue confirmada en las muestras procedentes del modelo condicional de delección de Cdh1 (**Fig. 21B**). Como se puede comprobar en los perfiles de ciclo de dichas muestras, los cultivos de MEFs mutantes están bloqueados en G0 y se comportan de la misma manera que los cultivos control (**Fig. 21A**), por lo que las diferencias de carga en cromatina no pueden achacarse a diferencias en el perfil de ciclo. En segundo lugar, observamos una cinética más rápida de carga de los complejos en cromatina tanto en los MEFs deficientes en Cdh1 (**Fig. 20**), como en los deplecionados de Cdh1 (**Fig. 21**), con respecto a sus controles, lo cual es consistente con la ya demostrada precocidad de entrada en fase S de las células mutantes. Esto resultó especialmente llamativo en el caso de algunas de las subunidades del complejo helicasa (MCM2, MCM3 y MCM4). Sin embargo, más allá de las diferencias en la cinética de carga, no se apreciaron deficiencias significativas en ningún punto post-reentrada para ninguna de las proteínas analizadas en los MEFs carentes o deplecionados de Cdh1, sugiriendo que la formación de los complejos pre-replicative no está inhibida en estas células. Este resultado no deja de ser sorprendente, ya que contradice la teoría ampliamente aceptada sobre la necesidad de contar con un complejo APC/C-Cdh1 funcional en G1, para garantizar un estado de baja actividad Cdk fundamental para el licenciamiento. Es posible, sin embargo, que en ausencia de Cdh1, Cdc20, que se estabiliza cuando no se expresa Cdh1, supla en parte la función de Cdh1 y sea capaz de mantener la actividad Cdk lo suficientemente baja como para permitir el licenciamiento de orígenes.

Estos experimentos nos permitieron comprobar asimismo que la fosforilación de MCM2 en la Ser53, asociada a la activación de orígenes, estaba incrementada en ausencia de Cdh1, sobre todo en los primeros tiempos de recogida tras estimular la reentrada en ciclo, es decir en G1 (**Figs. 20 y 21**). Esta última observación está en consonancia con los datos extraídos de los ensayos de fibras, que indicaban una mayor frecuencia de disparo de orígenes en las células

## Resultados



**Figura 21. (Página anterior). Análisis de la cinética de carga en cromatina de factores implicados en el licenciamiento y activación de orígenes tras la pérdida aguda de Cdh1 inducida por Adeno-Cre.** Se procedió de manera similar a lo descrito en la Figura 20, pero con MEFs Cdh1 (lox/lox) infectados con Adeno-Cre o con un adenovirus control, y sincronizados en G0 a los 5 días de la infección. Tras 72 h sin suero, se liberaron las células del bloqueo y se recogieron muestras cada 5 horas para llevar a cabo el fraccionamiento, marcándolas con EdU 1 hora antes de la recolección. **A.** Para confirmar que el bloqueo en G0 era efectivo y que la cinética de re-entrada en ciclo era similar en ambos cultivos se analizó por citometría de flujo y para cada muestra la incorporación de EdU en función del contenido en DNA (7-AAD). **B.** Inmunodetección por *Western Blot* de las proteínas indicadas en la fracción citosólica (paneles de la izquierda) y en la cromatínica (paneles de la derecha) de los cultivos infectados con el adenovirus señalado y recogidos a las horas especificadas tras la liberación del bloqueo en G0. Se incluyen asimismo los controles del fraccionamiento, MEK2 como proteína citosólica y la Histona H3 como proteína de cromatina. **C.** Cinética de carga en cromatina de algunas de las proteínas analizadas por *Western Blot*. Se muestran las gráficas correspondientes a Cdc6 (izquierda), MCM3 y MCM4 (centro) y fosfo-MCM2 (derecha) para las muestras de MEFs infectados con Adeno-Cre (rojo) o con un adenovirus control (azul). Se cuantificó la intensidad de las bandas obtenidas para cada proteína, y se normalizó con respecto a la intensidad de la Histona H3 para cada muestra.

carentes o deplecionadas de Cdh1.

### 3. APC/C-Cdh1 garantiza la eficiencia de la replicación mediante el control de las reservas intracelulares de dNTPs

Los datos ya expuestos demuestran que la pérdida total o parcial de Cdh1 induce estrés replicativo, y que, a pesar de que tanto la progresión de las horquillas replicativas como el disparo de orígenes se alteran en ausencia de Cdh1, es el avance de las horquillas lo que está primariamente comprometido en ausencia de Cdh1, siendo la hiperactivación de orígenes un posible efecto secundario. Pero, ¿cuál es el mecanismo subyacente por el cual la ausencia de Cdh1 provoca una ralentización de las horquillas? Considerando las distintas situaciones que podrían desencadenar este fenotipo, nos planteamos que una limitada disponibilidad de dNTPs podría causar los defectos percibidos en las células carentes o deplecionadas de Cdh1. En ese sentido, es importante tener en cuenta que no solo se ha comprobado que un déficit de dNTPs intracelulares interfiere negativamente en el avance de los replisomas, disminuyendo la velocidad de la horquilla (Anglana *et al.*, 2003; Bester *et al.*, 2011), sino que además se ha demostrado que APC/C-Cdh1 dirige la ubiquitinación de la subunidad pequeña de la ribonucleótido reductasa (RRM2), de la timidina quinasa (TK1), y de la timidilato quinasa (TMPK), todas ellas enzimas implicadas en la biosíntesis de nucleótidos (Chabes *et al.*, 2003; Ke y Chang, 2004). Por lo tanto, la falta de Cdh1 podría tener un impacto directo en las reservas intracelulares de nucleótidos.

#### 3.1. El aporte exógeno de dNTPs/nucleósidos corrige los defectos replicativos de los MEFs mutantes

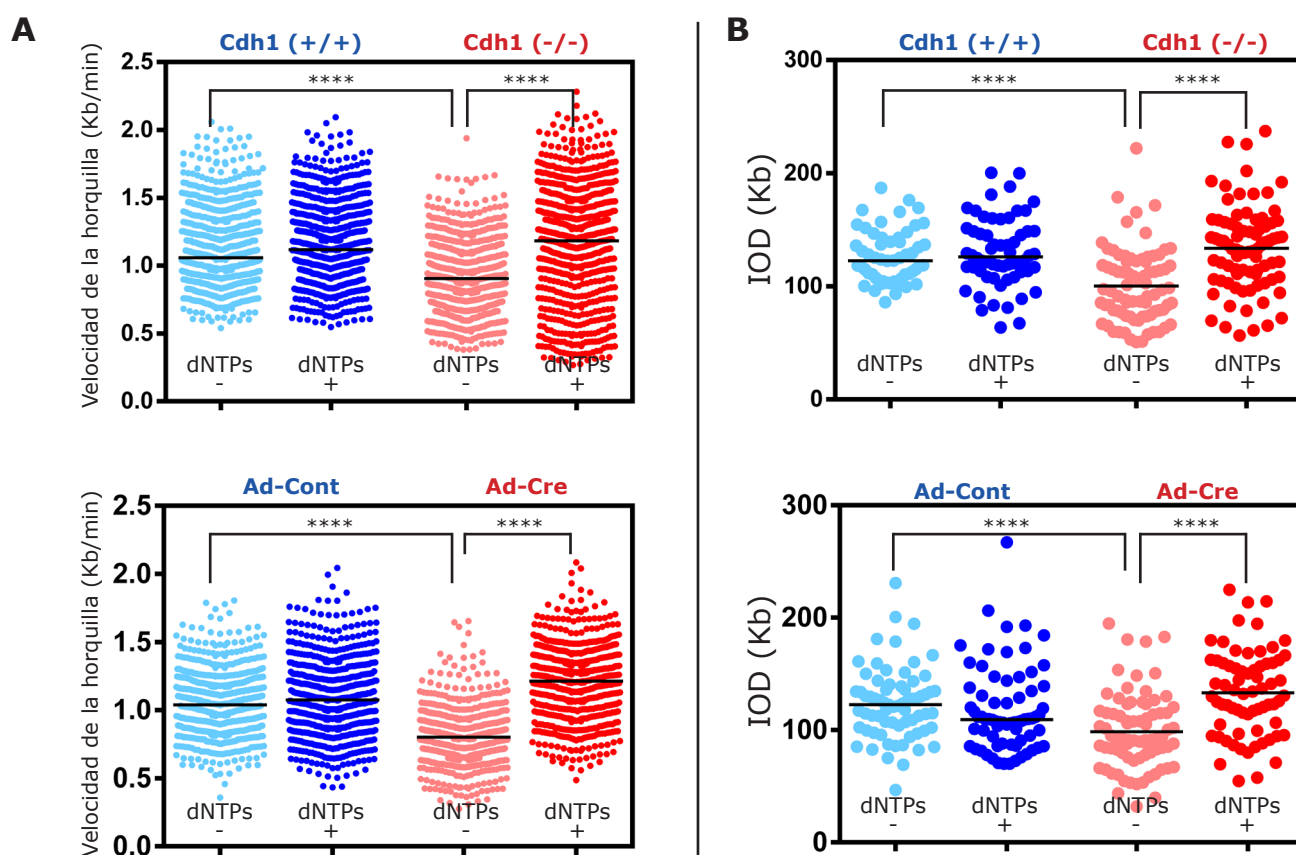
Considerando lo anterior, diseñamos experimentos de fibras en los que se analizó la velocidad



## Resultados

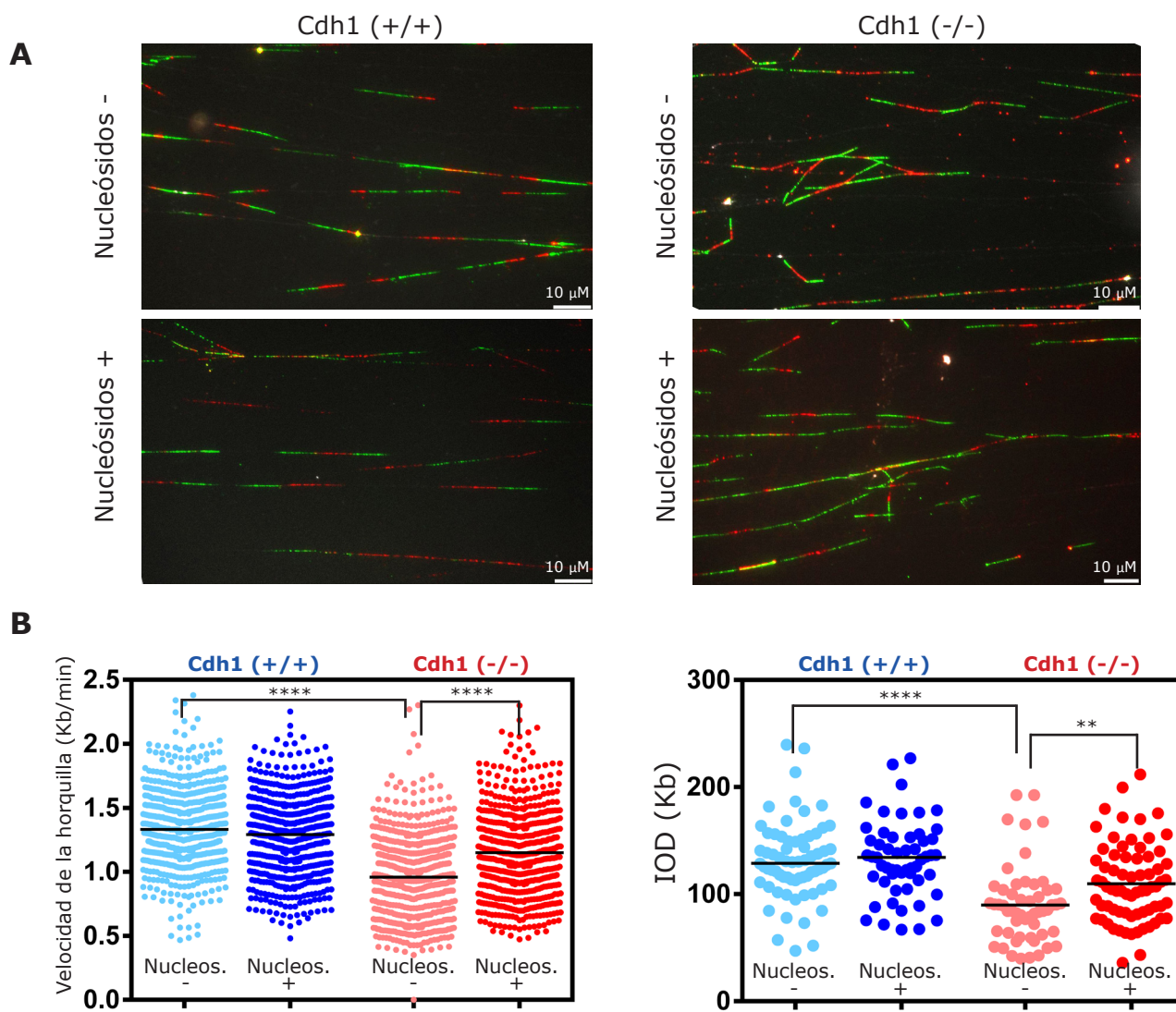
de las horquillas y la distancia entre orígenes tras suplementar el medio de cultivo de los MEFs con nucleótidos exógenos. Se utilizó una mezcla de los cuatro dNTPs, en las condiciones descritas en un trabajo previo (una concentración de 10  $\mu$ M durante 72 horas) (Gaglio *et al.*, 2009). Para nuestra sorpresa, se produjo una recuperación completa de la velocidad de las horquillas replicativas tanto en MEFs deficientes en Cdh1 como en MEFs condicionales infectados con Adeno-Cre (**Fig. 22A**). Dedujimos, por tanto, que, muy probablemente, los defectos en la progresión de las horquillas se debían a anomalías en las concentraciones intracelulares de nucleótidos. Pero además, pudimos comprobar que la adición de dNTPs al medio de cultivo también conseguía revertir la disminución en la distancia entre orígenes contiguos (**Fig. 22B**). Es decir, que el tratamiento con dNTPs logró compensar el exceso de activación de orígenes en los MEFs mutantes, sugiriendo que, como habíamos planteado en su momento, dicho exceso se debía muy probablemente a una estimulación compensatoria de los orígenes durmientes para rescatar a las horquillas paradas o colapsadas.

Más adelante, debido a las dudas planteadas por la comunidad científica sobre la capacidad



**Figura 22. El aporte exógeno de dNTPs revierte los defectos en la dinámica de replicación asociados a la pérdida de Cdh1.** Se añadió una mezcla de dNTPs (dATP, dCTP, dGTP y dTTP) 10  $\mu$ M al medio de cultivo de los MEFs y se crecieron durante 72 horas, tras las cuales se marcaron las células con dos pulsos de CldU e IdU, se recogieron, y se procesaron para realizar ensayos de fibras de DNA. **A.** Se analizó la velocidad de las horquillas replicativas en MEFs control y deficientes en Cdh1 (panel superior) o bien en células portadoras del alelo condicional de Cdh1 e infectadas con Adeno-Cre o con un adenovirus control (panel inferior). Se realizaron entre 500 y 800 mediciones en 2-3 ensayos independientes. **B.** Se analizó igualmente el efecto del tratamiento con dNTPs sobre la distancia entre orígenes contiguos (IOD), en los mismos cultivos de MEFs que en A. En este caso se realizaron un mínimo de 50 mediciones para cada muestra. (\*\*\*\*p<0,0001).

de los dNTPs de atravesar eficientemente la membrana plasmática, y a que en la mayoría de los trabajos recientes utilizaban formas no fosforiladas de los nucleótidos (es decir, nucleósidos) (Bester *et al.*, 2011; Beck *et al.*, 2012), decidimos repetir algunos de los ensayos de fibras añadiendo nucleósidos exógenos en lugar de dNTPs (**Fig. 23**). Los resultados fueron similares a los obtenidos con dNTPs, si bien es cierto que en este caso la corrección de los defectos no fue completa. Aunque no tenemos una explicación razonable para esta diferencia, sí cabría destacar que las concentraciones de nucleósidos utilizadas en otros estudios similares a éste (López-Contreras *et al.*, 2015) son entre 3 y 6 veces superiores a la empleada en estos experimentos (10  $\mu$ M), lo que sugiere que podría ser insuficiente para conseguir un efecto equivalente al de los dNTPs.

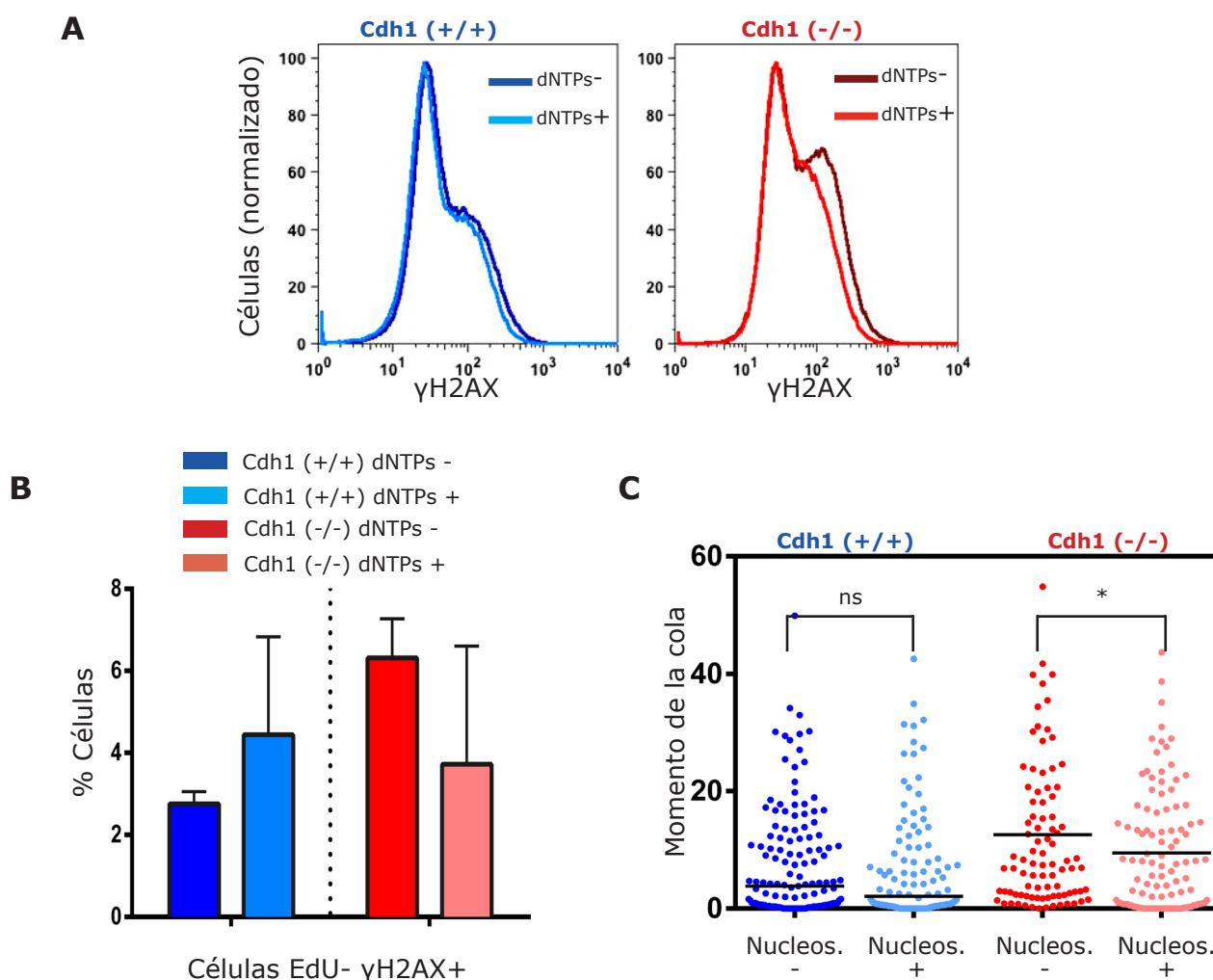


**Figura 23. La adición de nucleósidos también corrige los defectos en la dinámica de replicación en MEFs carentes de Cdh1.** Se realizaron experimentos análogos a los descritos en la Figura 22, pero añadiendo al medio de cultivo una mezcla de nucleósidos (adenosina, guanosina, citidina, timidina y uridina) 10  $\mu$ M e incubando los MEFs durante 72 horas, antes de marcarlos con CldU e IdU para poder realizar los ensayos de fibras de DNA. **A.** Se muestran imágenes representativas de la detección de segmentos de DNA marcados con los análogos de timidina para cada una de las muestras analizadas. **B.** Datos de velocidad de las horquillas replicativas (panel izquierdo) y distancia entre orígenes contiguos (IOD, panel derecho) en muestras de MEFs control (azul) y mutantes (rojo) tratados con nucleósidos (Nucleos. +) o sin tratar (Nucleos. -). Se realizaron un mínimo de 500 mediciones para determinar la velocidad de las horquillas y al menos 50 para valorar la IOD. (\*\* $p < 0,01$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ ).

### 3.2. La adición de nucleótidos rescata parcialmente el fenotipo de inestabilidad genética en células deficientes en Cdh1

Si, como pensábamos, la inestabilidad genética asociada a la falta de Cdh1 estaba causada, al menos en parte, por el estrés replicativo, los signos de daño en el DNA se aliviarían al corregir los defectos replicativos con nucleótidos/nucleósidos exógenos. Para comprobarlo, re-evaluamos varios de los signos de daño en MEFs deficientes o deplecionados de Cdh1 tras suplementarlos con dichas moléculas.

En primer lugar, analizamos la señal de  $\gamma$ H2AX por citometría (Fig. 24A). Si bien las diferencias nunca llegaron a ser muy notables, sí se advirtió una disminución del porcentaje total de células positivas para  $\gamma$ H2AX en los cultivos de MEFs deficientes en Cdh1 tratados con dNTPs, mientras que la señal de  $\gamma$ H2AX en las células control no se vio alterada por el tratamiento.

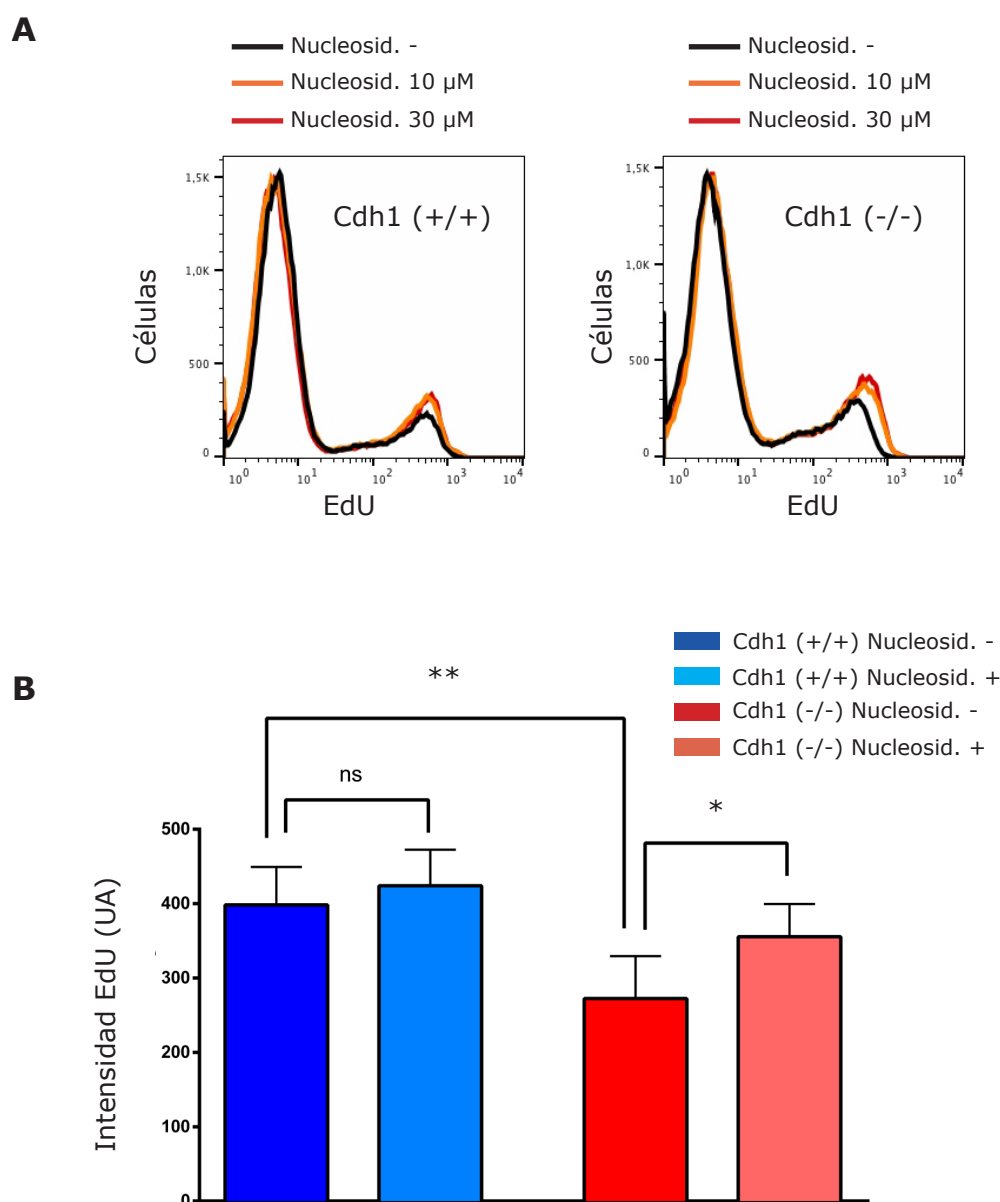


**Figura 24. La adición de dNTPs o nucleósidos rescata parcialmente el fenotipo de inestabilidad genética en MEFs deficientes en Cdh1.** **A.** Efecto del tratamiento con dNTPs sobre la señal de  $\gamma$ H2AX detectada por citometría de flujo. Se muestran los histogramas superpuestos para cultivos de MEFs control (azul) o deficientes en Cdh1 (rojo), sin tratar (dNTPs -) o tratados (dNTPs +). **B.** El mismo tratamiento se aplicó a cultivos de MEFs que se procesaron para detectar focos de  $\gamma$ H2AX por microscopía de fluorescencia. El gráfico muestra la cuantificación de células con focos de  $\gamma$ H2AX dentro de la población celular que no incorpora EdU tras un pulso de 2 h. **C.** Cuantificación de roturas en el DNA mediante ensayos de cometa en cultivos de MEFs control (azul) y mutantes (rojo) no tratados (Nucleos -) o tratados durante 72 h con nucleósidos 10  $\mu$ M (Nucleos +). (\* $p < 0,05$ ).



Quisimos afianzar estos resultados cuantificando igualmente los focos de  $\gamma$ H2AX por inmunofluorescencia (**Fig. 24B**). En este caso, conviene resaltar que no se observaron diferencias en el porcentaje total de células con focos de  $\gamma$ H2AX tras la adición de dNTPs al medio de cultivo. Ahora bien, cuando analizamos la población de células que no estaban replicando, es decir, aquellas que dieron señal negativa para EdU, sí se hizo patente una reducción del número de células con focos de  $\gamma$ H2AX en los MEFs deficientes en Cdh1 suplementados con dNTPs.

Finalmente, por tratarse de una técnica más sensible para la detección y cuantificación de



**Figura 25. Efecto de la adición de nucleósidos sobre la eficiencia de la replicación en MEFs constitutivamente deficientes en Cdh1.** **A.** Cultivos asíncronos de MEFs control (panel izquierdo) o deficientes en Cdh1 (panel derecho) se crecieron durante 48h en medio normal o en presencia de nucleósidos (10  $\mu$ M ó 30  $\mu$ M) y se incubaron con EdU una hora antes de recogerlos, fijarlos y procesarlos para citometría de flujo. Los gráficos muestran los histogramas superpuestos de la señal fluorescente de EdU, en cultivos sin tratar o tratados con nucleósidos. **B.** Representación gráfica de la intensidad media de la señal de EdU detectada por citometría de flujo (unidades arbitrarias) en los cultivos de MEFs control (azul) o mutantes (rojo) tratados como se describe en A. (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ).

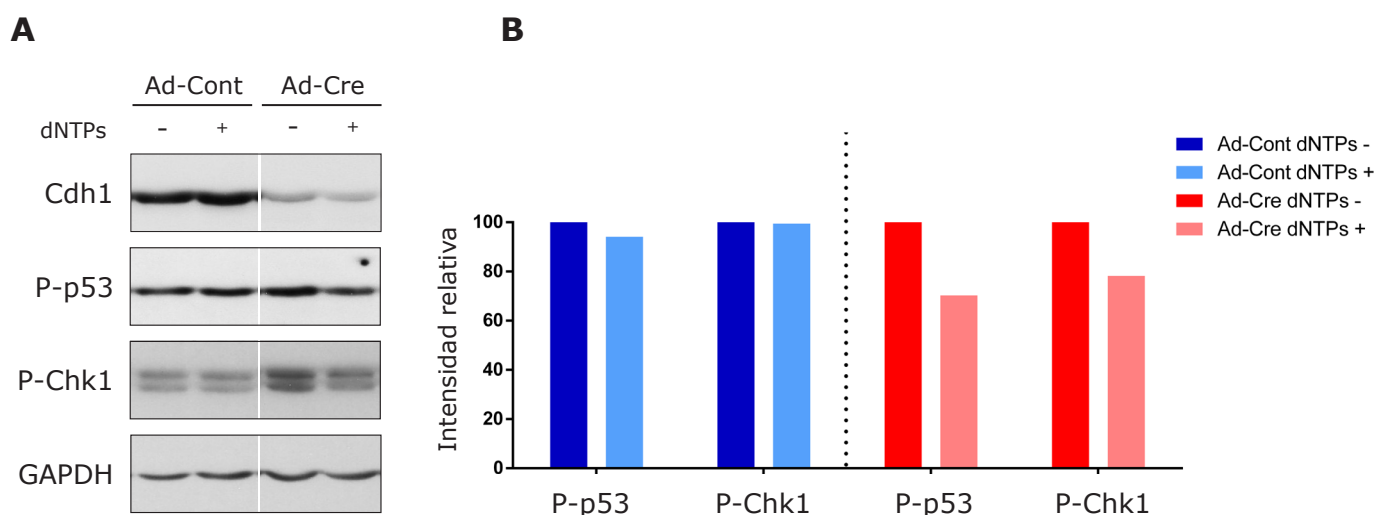
## Resultados

roturas en el DNA, decidimos realizar ensayos de cometa en MEFs tratados, esta vez, con nucleósidos. De este modo, pudimos comprobar que la adición de nucleósidos al medio de cultivo disminuía significativamente la incidencia de roturas en el DNA de los MEFs constitutivamente deficientes en Cdh1, en tanto que en las células control el mismo tratamiento no produjo diferencias significativas en el número de roturas (**Fig. 24C**).

Para corroborar aún más la recuperación de los defectos replicativos después del tratamiento con nucleósidos, llevamos a cabo ensayos para determinar por citometría de flujo la intensidad de fluorescencia del EdU añadido a los cultivos una hora antes de recolectar las células, lo que nos daría una idea de la posible corrección en la eficiencia de replicación. Nuevamente, los MEFs mutantes tratados con nucleósidos exhibieron una significativa recuperación del valor de intensidad del EdU, mientras que en los MEFs silvestres las diferencias no fueron significativas entre la situación control y la de adición de nucleósidos (**Figura 25**).

Paralelamente a estos estudios, consideramos oportuno evaluar por técnicas bioquímicas el efecto del tratamiento con dNTPS sobre el estado de activación de la ruta de respuesta a daño en células deplecionadas de Cdh1. Así, pudimos evidenciar una disminución tanto de los niveles de fosfo-Chk1 como de los de fosfo-p53 en MEFs primarios deficientes en Cdh1 tras el tratamiento con nucleótidos, confirmando que se está produciendo menos daño y por lo tanto se está atenuando la respuesta celular al mismo (**Figura 26**).

En conjunto, estos datos refuerzan la idea de que los defectos replicativos originados, posiblemente, por alteraciones en las reservas intracelulares de dNTPs, estarían contribuyendo decisivamente a la inestabilidad genética asociada a la ausencia de Cdh1.

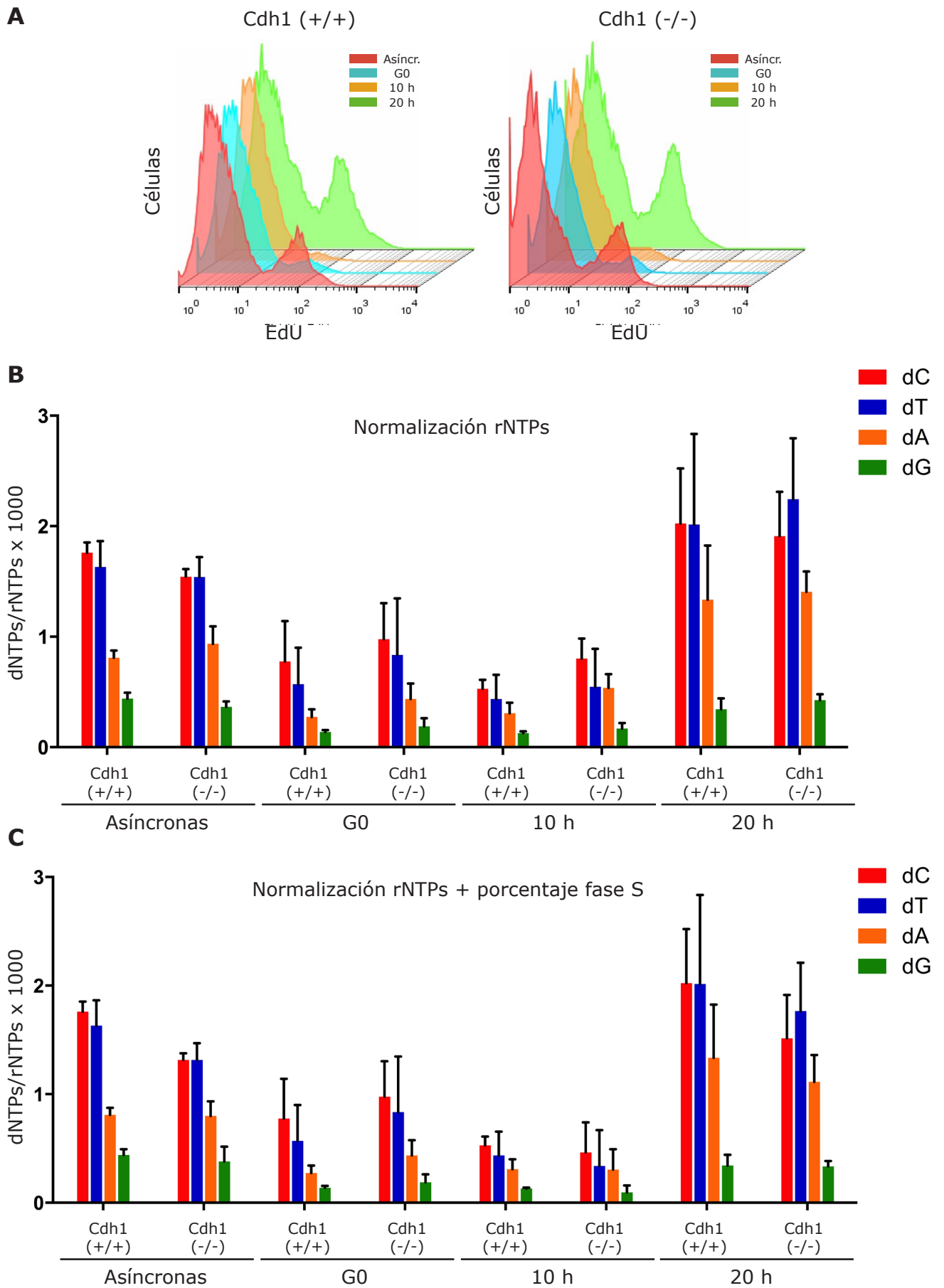


**Figura 26. La adición de nucleótidos al medio de cultivo atenúa la activación de la ruta de respuesta daño tras la pérdida de Cdh1.** **A.** Inmunodetección por *Western Blot* de las proteínas indicadas en lisados totales de MEFs Cdh1 (lox/lox) infectados con Adeno-Cre o con un adenovirus control y crecidos en medio normal o suplementado con dNTPs. **B.** Cuantificación de la abundancia relativa de fosfo-p53 y fosfo-Chk1 con respecto al nivel detectado en las muestras correspondientes a cultivos no suplementados con dNTPs. Los valores de la cuantificación se normalizaron previamente con respecto al control de carga, GAPDH.

### 3.3. Cuantificación de los niveles intracelulares de dNTPs en las células carentes en Cdh1

Puesto que la adición de nucleótidos exógenos era capaz de corregir los defectos en la dinámica de replicación de las células carentes de Cdh1, supusimos que en dichas células existían déficits o desequilibrios en las reservas de dNTPs disponibles para la síntesis del DNA. Para verificar si, efectivamente, estábamos en lo cierto, decidimos cuantificar los niveles intracelulares de cada uno de los dNTPs. Para ello establecimos una colaboración con el Dr. Andrei Chabes (Universidad de Umeå, Suecia) que combina técnicas cromatográficas y de espectrometría de masas para determinar la concentración de nucleótidos en extractos de células.

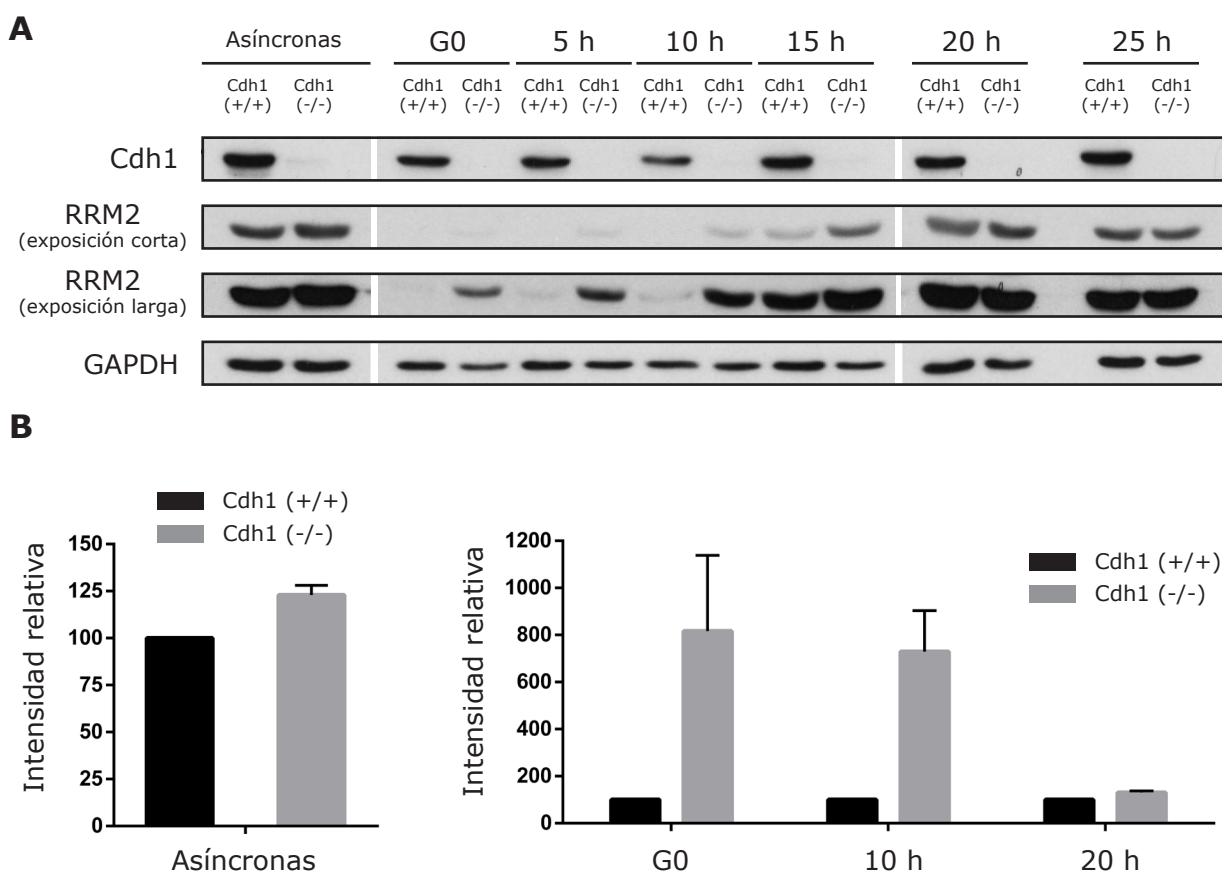
Generamos extractos de cultivos asíncronos de MEFs control y deficientes en Cdh1, así como de cultivos sincronizados en G0 y recogidos a tiempo 0 (fase G0), a las 10 horas (fase G1), y a las 20 horas (fase S) tras la liberación del bloqueo y la re-estimulación con suero. Para cada muestra se cuantificaron tanto los deoxinucleótidos como los ribonucleótidos y se normalizaron los datos para cada uno de los dNTPs con respecto a los valores del correspondiente ribonucleótido para minimizar las diferencias en número de células o en la eficiencia de la extracción. Los datos obtenidos con tres parejas de MEFs control y mutantes aparecen resumidos en la **Figura 27B** en la que se observan escasas diferencias entre las muestras de uno y otro genotipo, a excepción de las correspondientes a los cultivos sincronizados en G0 y en las muestras recogidas a las 10 horas (fase G1), en las que se evidencia un moderado aumento de las reservas generales de nucleótidos. A la vista de estos resultados, consideramos que tal vez debíamos tener en cuenta el porcentaje de células en fase S en cada caso, puesto que el nivel intracelular de dNTPs aumenta muy significativamente en ese periodo y, como ya se ha mostrado, en ausencia de Cdh1 el porcentaje de células en dicha fase del ciclo en un cultivo asíncrono es siempre ligeramente superior al de un cultivo de MEFs control. Por lo tanto, normalizamos los valores de cada cuantificación con respecto al nivel de ribonucleótidos y adicionalmente con respecto a la fracción de células positivas para EdU (por lo tanto, en fase S) en cada caso. Como se observa en el gráfico de la **Figura 27C**, tanto las muestras de cultivos asíncronos deficientes en Cdh1 como las de los cultivos recogidos a las 20 h, y por tanto enriquecidos en células en fase S, manifiestan una moderada deficiencia en la concentración intracelular de dNTPs, especialmente dCTP y dTTP, con respecto a las muestras equivalentes de cultivos control. Cuesta creer que diferencias de esa magnitud tengan un impacto tan claro en la replicación de los MEFs deficientes en Cdh1, pero más allá de las limitaciones propias del método de cuantificación no tenemos a día de hoy otra explicación convincente.



**Figura 27. (Página anterior). Cuantificación de los niveles intracelulares de dNTPs.** Se determinaron las reservas intracelulares de dNTPs por técnicas cromatográficas tanto en cultivos asíncronos de MEFs control y deficientes en Cdh1, como en cultivos sincronizados en G0 y recogidos a las 0, 10 (G1) y 20 horas (fase S) tras la liberación del bloqueo por adición de suero al medio de cultivo. **A.** Perfil de incorporación de Edu detectado por citometría de flujo en los cultivos control y mutantes empleados para la cuantificación de dNTPs. Las células se incubaron con Edu 2 horas antes de recogerlas. **B.** Datos de la cuantificación de cada uno de los cuatro nucleótidos (dATP, dCTP, dGTP y dTTP) en las muestras asíncronas y en las sincronizadas procedentes de tres experimentos independientes. En este caso los datos crudos de cada deoxinucleótido se normalizaron con respecto a la concentración del correspondiente ribonucleótido. **C.** Adicionalmente, los datos representados en B, se normalizaron atendiendo a la relación de células en fase S (positivas para EdU) con respecto a los cultivos de MEFs control en cada condición.

### 3.4. La ausencia de Cdh1 origina perturbaciones en la degradación de enzimas implicadas en la biosíntesis de dNTPs

Puesto que ya se había descrito con anterioridad que APC/C-Cdh1 era la ubiquitina ligasa responsable de iniciar la degradación en G1 de TK1, TMPK, y RRM2 (Chabes *et al.*, 2003; Ke y Chang, 2004), quisimos verificar si en nuestras células desprovistas de Cdh1 se producía una estabilización de los niveles de estas enzimas. Para ello realizamos *Western Blots* utilizando

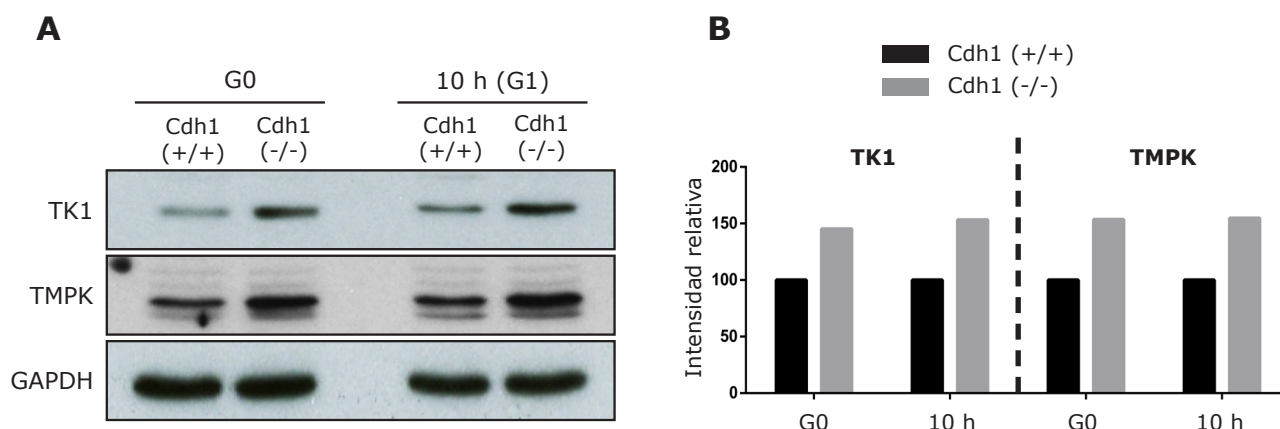


**Figura 28. La ausencia de Cdh1 conduce a una marcada estabilización de la subunidad pequeña de la ribonucleótido reductasa (RRM2) en G0 y G1.** **A.** Se analizaron por Western Blot los niveles de la subunidad pequeña de la ribonucleótido reductasa (RRM2) en MEFs control y deficientes en Cdh1, creciendo en cultivo asíncrono o bien sincronizados en G0 y recogidos a distintos tiempos tras promover su re-entrada en ciclo (cada 5 horas hasta llegar a las 25 horas). **B.** Cuantificación de la intensidad relativa de la banda correspondiente a RRM2 con respecto a la intensidad detectada en cada una de las muestras control. El panel izquierdo resume los datos obtenidos con cultivos asíncronos mientras que en el panel derecho se muestran los datos para los cultivos sincronizados. Los datos se normalizaron adicionalmente con respecto al control de carga (GAPDH).

## Resultados

anticuerpos específicos para cada enzima.

En primer lugar analizamos muestras procedentes de cultivos asíncronos, no detectando diferencias muy aparentes entre los MEFs control y los deficientes en Cdh1. Sin embargo, el estudio de muestras sincronizadas en G0 y recogidas a distintos tiempos después de la re-estimulación con suero, reveló cambios más interesantes. En el caso de las enzimas de la ruta de rescate de timidina (TK1 y TMPK), se observó un discreto incremento de los niveles totales de proteína en las muestras procedentes de MEFs deficientes en Cdh1 con respecto a los MEFs control (**Fig. 29**). Pero las diferencias más notables se obtuvieron sin duda al analizar los niveles de RRM2 (**Fig. 28**). La comparación entre las muestras control y *KO* para Cdh1 puso de manifiesto una considerable estabilización de la subunidad pequeña de la ribonucleótido reductasa en ausencia de Cdh1, especialmente reseñable en las muestras correspondientes a cultivos sincronizados en G0 y G1 (5 h y 10 h). La cuantificación de la intensidad relativa de las bandas de RRM2 correspondientes a cada muestra reveló incrementos de hasta 10 veces en los MEFs mutantes en G0 y en las primeras horas tras la liberación del bloqueo. Posteriormente, a medida que las células avanzan por G1 y entran en la fase S, las diferencias tienden a atenuarse, si bien en todo momento las células que no expresan Cdh1 muestran niveles algo más altos de RRM2. Esto podría explicar, de algún modo, el incremento en las concentraciones intracelulares de dNTPs observado en las muestras de MEFs deficientes en Cdh1 sincronizados en G0 (ver **Figura 27**).



**Figura 29. La ausencia de Cdh1 también incrementa los niveles de TK1 y TMPK en G0 y G1.** **A.** Análisis de los niveles de timidina quinasa (TK1) y timidilato quinasa (TMPK) por *Western Blot* en lisados totales de MEFs control o deficientes en Cdh1 sincronizados en G0 o en G1. **B.** Abundancia relativa de TK1 y TMPK en las muestras indicadas con respecto a la intensidad de la banda detectada en cada muestra control. Los datos se normalizaron adicionalmente con respecto al control de carga (GAPDH)

#### 4. Influencia de la actividad Cdk sobre los defectos replicativos en las células deficientes en Cdh1

Como ya se ha mencionado en múltiples ocasiones a lo largo de esta memoria, el complejo APC/C-Cdh1 contribuye a mantener una baja actividad Cdk desde anafase hasta final de la fase G1 (Skaar y Pagano, 2008; Li y Zhang, 2009; Manchado *et al.*, 2010). De hecho, previamente se había confirmado un exceso de actividad Cdk1 y Cdk2 en G1 en MEFs inmortalizados deficientes en Cdh1 (García-Higuera *et al.*, 2008). Para verificar si también en MEFs primarios la ausencia de Cdh1 provoca un aumento de la actividad Cdk utilizamos un anticuerpo fosfoespecífico que reconoce fosfo-Serinas en el contexto de una secuencia consenso para CDKs. Como era de esperar, detectamos un incremento de la señal particularmente claro en muestras de MEFs deficientes en Cdh1 y sincronizados en G0 por eliminación de suero, con respecto a muestras equivalentes de MEFs control (**Fig. 34A**). Confirmado este aspecto, decidimos profundizar sobre la influencia que ese exceso de actividad Cdk podía tener sobre los fenotipos de estrés replicativo e inestabilidad genética que habíamos caracterizado en MEFs deficientes en Cdh1. Para ello nos planteamos dos aproximaciones complementarias : una aproximación genética y una aproximación basada en el uso de inhibidores químicos. Para la primera aprovechamos la existencia de un modelo de ratón deficiente en Skp2 y generamos cultivos primarios de MEFs con la doble mutación en Cdh1 y Skp2. Para la segunda empleamos inhibidores conocidos contra los complejos ciclina-Cdks, como la roscovitina.

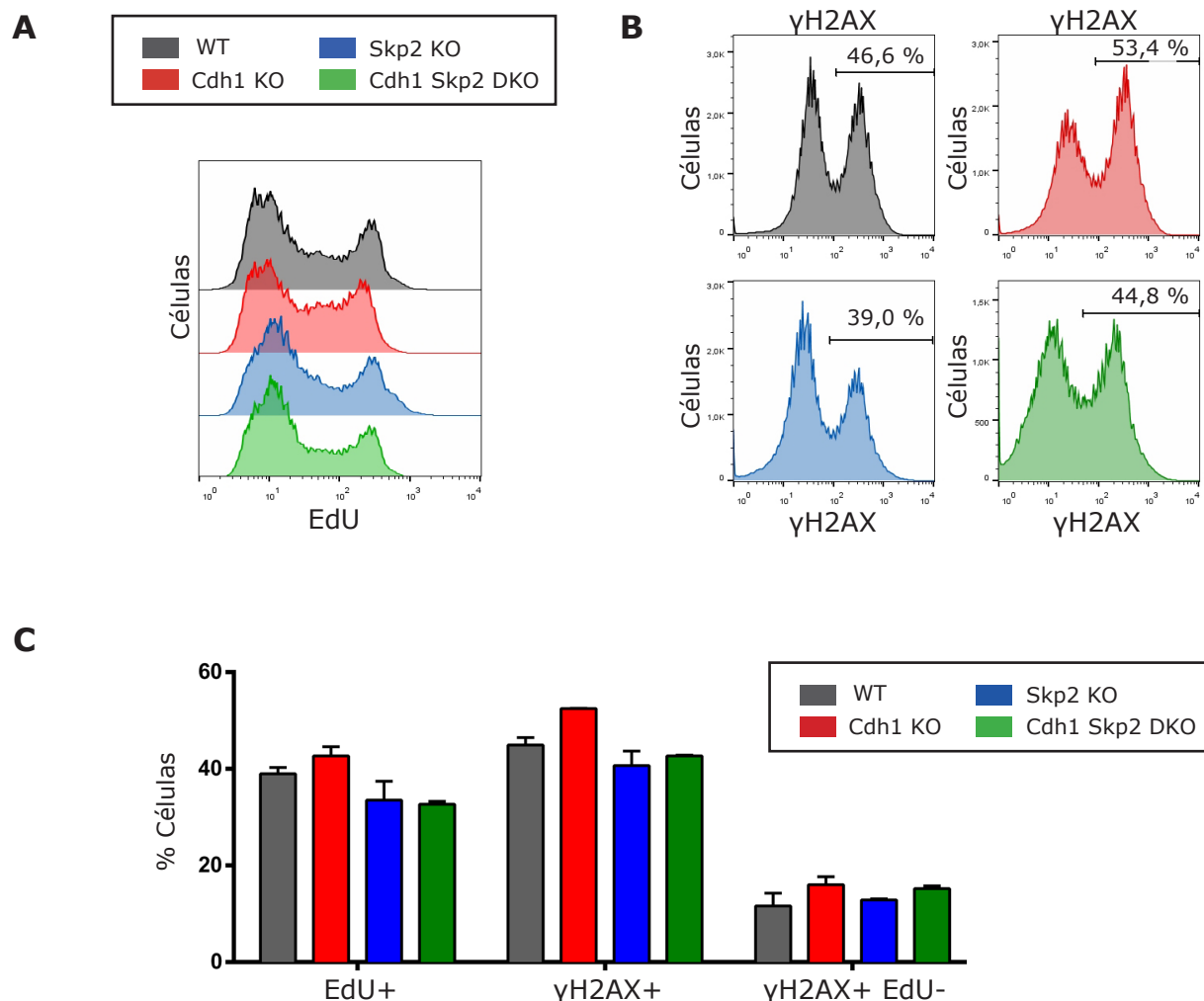
##### 4.1. Caracterización de MEFs doblemente deficientes en Cdh1 y Skp2

Uno de los mecanismos por lo cuales APC/C-Cdh1 limita la actividad Cdk es mediante la ubiquitinación de Skp2, subunidad de reconocimiento de sustratos del complejo SCF (Bashir *et al.*, 2004). La estabilización de Skp2 en ausencia de Cdh1, evidente también en MEFs primarios (ver **Fig. 32A**), fomenta la degradación de p27, atenuando de esta forma su acción inhibitoria sobre los complejos ciclina-Cdk. En consecuencia, la delección combinada de Cdh1 y Skp2 debería restablecer los niveles de p27 y reducir la actividad Cdk. Por ese motivo consideramos que los MEFs con la doble mutación podían ser una herramienta útil para examinar la influencia del exceso de actividad Cdk sobre las alteraciones ya descritas de las células carentes de Cdh1.

Inicialmente se analizó por citometría de flujo el grado de daño endógeno que padecían estas células, cuantificando el porcentaje de células positivas para  $\gamma$ H2AX. Se comprobó que mientras los cultivos de MEFs deficientes en Skp2 presentaban una menor proporción de células con señal positiva para la histona fosforilada que los cultivos de MEFs deficientes en Cdh1 (en parte probablemente por un menor porcentaje de células proliferando en los primeros), las células

## Resultados

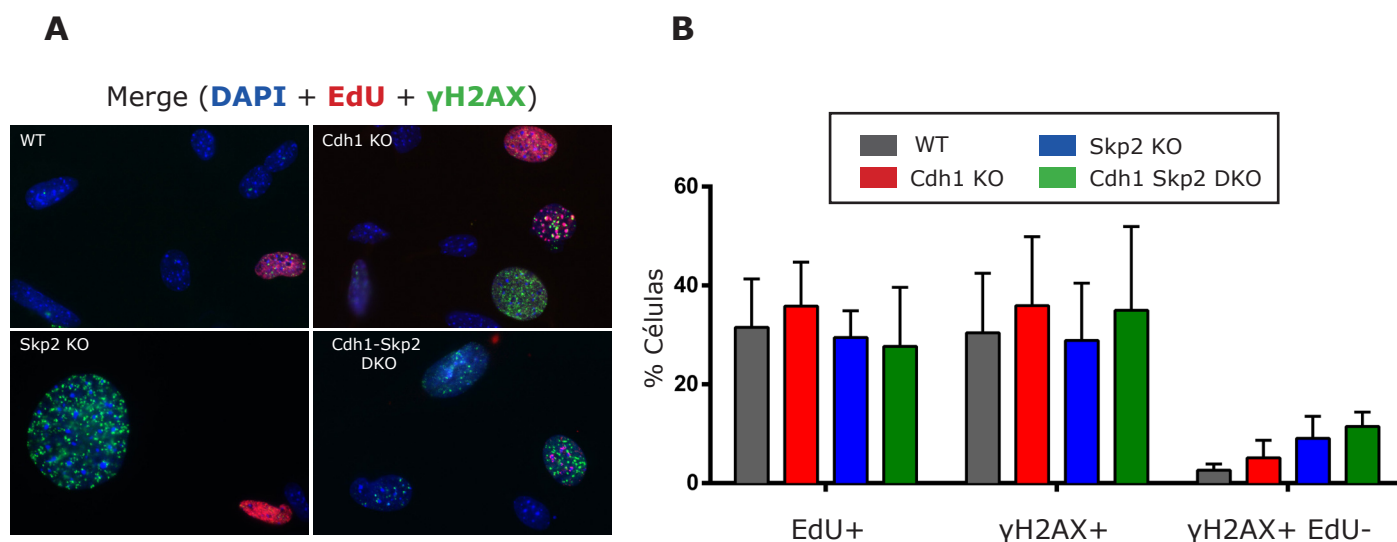
con la doble mutación mostraron un fenotipo que podría considerarse intermedio entre los dos mutantes simples. Sin embargo, el porcentaje de células con daño que no estaban replicando su DNA (células positivas para  $\gamma$ H2AX pero negativas para EdU) era similar en los MEFs con la delección combinada que en los MEFs deficientes únicamente en Cdh1 y siempre mayor que en los cultivos control (**Fig. 30**)



**Figura 30. Análisis de daño endógeno por detección  $\gamma$ H2AX por citometría de flujo en MEFs doblemente deficientes en Cdh1 y Skp2.** Cultivos asíncronos de MEFs control (gris), mutantes sencillos para Cdh1 (rojo), mutantes sencillos para Skp2 (azul) y dobles mutantes para Cdh1 y Skp2 (verde) se incubaron en presencia de EdU 10  $\mu$ M durante 2 horas y se procesaron para detectar la incorporación del análogo de timidina y la expresión de  $\gamma$ H2AX por citometría de flujo. **A.** Perfiles representativos de incorporación de EdU de los distintos cultivos. **B.** Perfiles representativos de expresión de  $\gamma$ H2AX en los mismos cultivos. **C.** Representación gráfica de los datos compendiados de cuantificación de células positivas para EdU (izquierda), positivas para  $\gamma$ H2AX (centro), o positivas para  $\gamma$ H2AX pero negativas para EdU (derecha) en los distintos cultivos.

Quisimos confirmar estos resultados realizando ensayos de inmunodetección de  $\gamma$ H2AX por inmunofluorescencia. En este caso no se observaron diferencias significativas en el porcentaje de células con focos de  $\gamma$ H2AX entre los MEFs deficientes en Cdh1 y los dobles mutantes (**Fig. 31**). Es más, el número de células positivas para  $\gamma$ H2AX que no se encontraban en fase S (señal



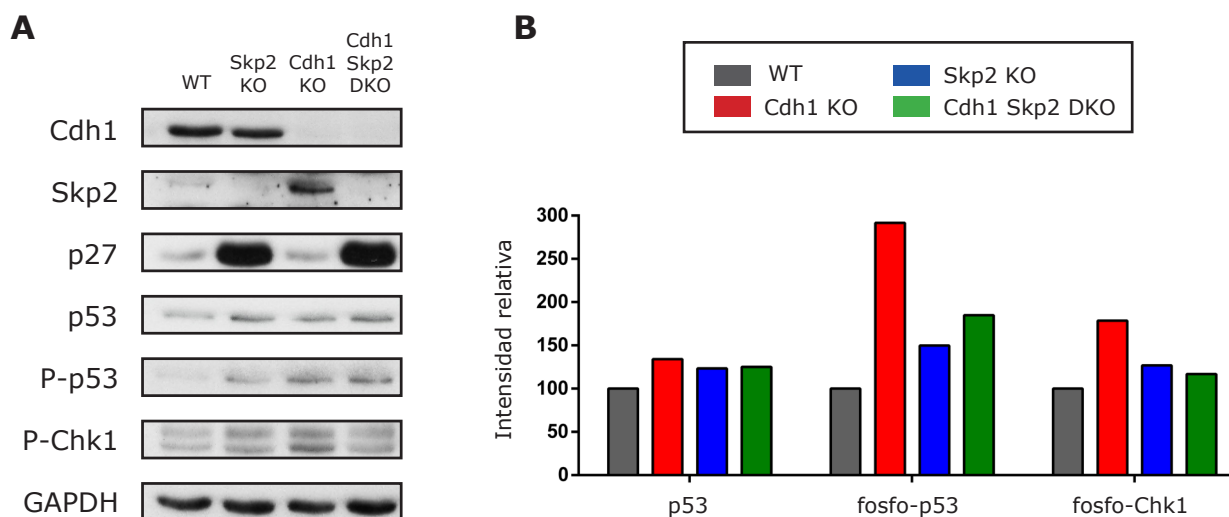


**Figura 31. Cuantificación de células con focos de  $\gamma$ H2AX en cultivos de MEFs con la deficiencia combinada en Cdh1 y Skp2.** A. Imágenes representativas de la detección de  $\gamma$ H2AX (verde) y EdU (rojo) por microscopía de fluorescencia en los distintos cultivos de MEFs (control, mutantes sencillos de Cdh1, mutantes sencillos de Skp2 y dobles mutantes). B. Cuantificación del porcentaje de células positivas para EdU (izquierda), con focos de  $\gamma$ H2AX (centro) o con focos de  $\gamma$ H2AX pero negativas para EdU (derecha) en cultivos de MEFs control (gris), deficientes en Cdh1 (rojo), deficientes en Skp2 (azul) o doblemente deficientes en Cdh1 y Skp2 (verde).

de EdU negativa), resultó mayor en los cultivos de MEFs con la doble delección que en el resto de cultivos (**Fig. 31B**).

Al analizar por *Western Blot* las muestras procedentes de estos MEFs primarios (**Fig. 32**) comprobamos que el nivel de p53, fosfo-p53 y fosfo-Chk1 en MEFs con la doble mutación era superior al de MEFs control pero algo más bajo que en MEFs deficientes en Cdh1, sugiriendo que el grado de activación de la ruta de respuesta a daño sería también intermedio. Pero quizás lo más llamativo fue el nivel de estabilización de la proteína p27 en las células que no expresan Skp2, ya sea en presencia o en ausencia de Cdh1. Este incremento tan exagerado de la cantidad total de p27 respecto a las células control podría desvirtuar el objetivo inicial de esta aproximación, que no era otro que contrarrestar el exceso de actividad Cdk en el contexto de la falta de Cdh1. Sin embargo, debido a la dramática sobreexpresión de p27, la inhibición de la actividad Cdk podía ir más allá de lo deseable y reducirla por debajo de los niveles fisiológicos propios de MEFs control, lo que sin duda complicaba la interpretación de los resultados. De hecho, ya se había descrito que el modelo de ratón deficiente en Skp2 evidenciaba una serie de alteraciones ostensibles relacionadas en su mayoría con la acumulación de p27, como un menor tamaño del animal, un incremento del porcentaje de células con núcleos grandes y poliploides o una disminuida tasa de proliferación (Nakayama *et al.*, 2000).

A pesar de estas dificultades, decidimos continuar con el estudio y analizar la dinámica de replicación en estos MEFs a través de ensayos de fibras de DNA (**Figura 33**). Los MEFs carentes de Skp2 no mostraron diferencias relevantes en cuanto a la velocidad de la horquilla y la



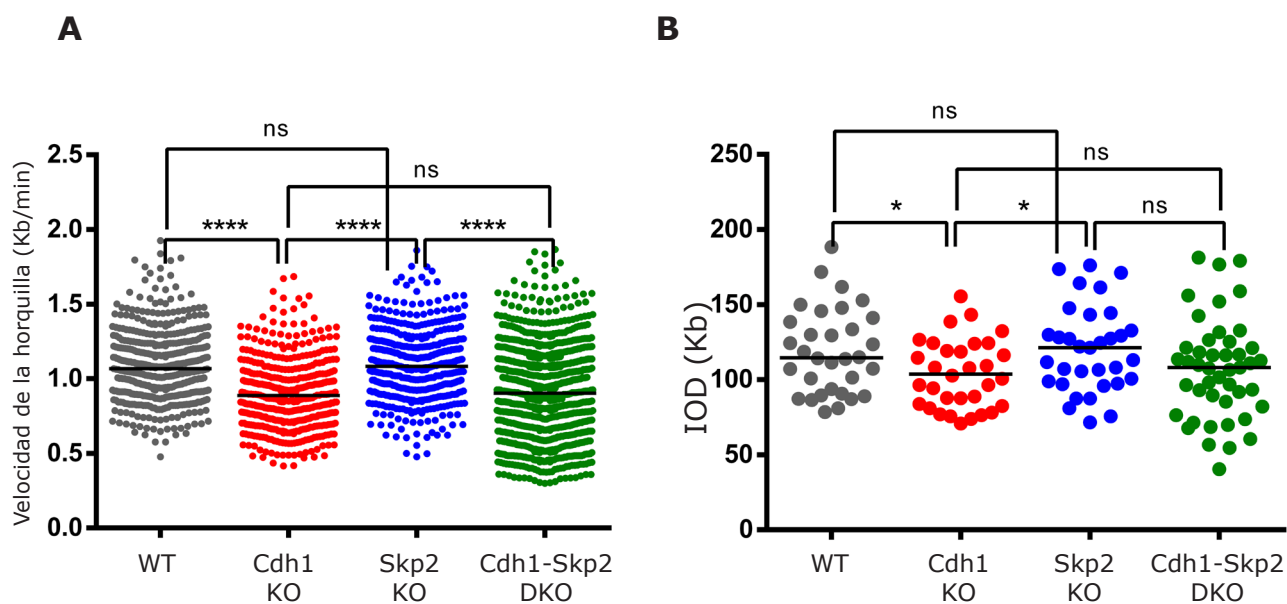
**Figura 32. Caracterización bioquímica de MEFs doblemente deficientes en Cdh1 y Skp2.** **A.** Inmunodetección por *Western Blot* de las proteínas indicadas en lisados totales de MEFs control, deficientes en Cdh1, deficientes en Skp2, o con la doble deficiencia en Cdh1 y Skp2. **B.** Cuantificación de las abundancia relativa de p53, fosfo-p53 y fosfo-Chk1 con respecto al nivel detectado en células control. Los valores obtenidos se normalizaron previamente con respecto al control de carga (GAPDH).

distancia entre orígenes contiguos. Por contra, ambos parámetros fueron inferiores a los de células control en el caso de los MEFs con la doble delección de Cdh1 y Skp2, y muy similares a los obtenidos para MEFs deficientes únicamente en Cdh1, si bien es cierto que la dispersión de los datos, y por tanto la variabilidad, era mayor en los primeros. Estos resultados indican que la pérdida adicional de Skp2 no consigue corregir los defectos replicativos inducidos por la ausencia de Cdh1.

### 4.2. Efecto de la inhibición química de la actividad Cdk en MEFs deficientes en Cdh1

Para tratar de modular de una manera más fina la actividad Cdk en las células en cultivo, se optó por la utilización de un inhibidor selectivo de Cdks, la roscovitina, capaz de reprimir la actividad de Cdk1 y Cdk2, fundamentalmente. En primer lugar, se testaron distintas dosis de la droga en tratamientos de 12 y 24 h para elegir aquella concentración que redujera la fosforilación dependiente de Cdk, pero que no detuviera el programa de ciclo, influyendo en la menor medida posible sobre el porcentaje de células proliferando. Así, se comprobó que una concentración de roscovitina de 10  $\mu$ M durante 12 h era suficiente para provocar una disminución de la actividad Cdk pero sin tener importantes consecuencias sobre la proliferación celular (**Fig. 34B**).

Por tratarse de una aproximación bastante rápida para analizar el efecto de la roscovitina sobre las células mutantes y con el objeto de verificar si la inhibición de la actividad Cdk en estos

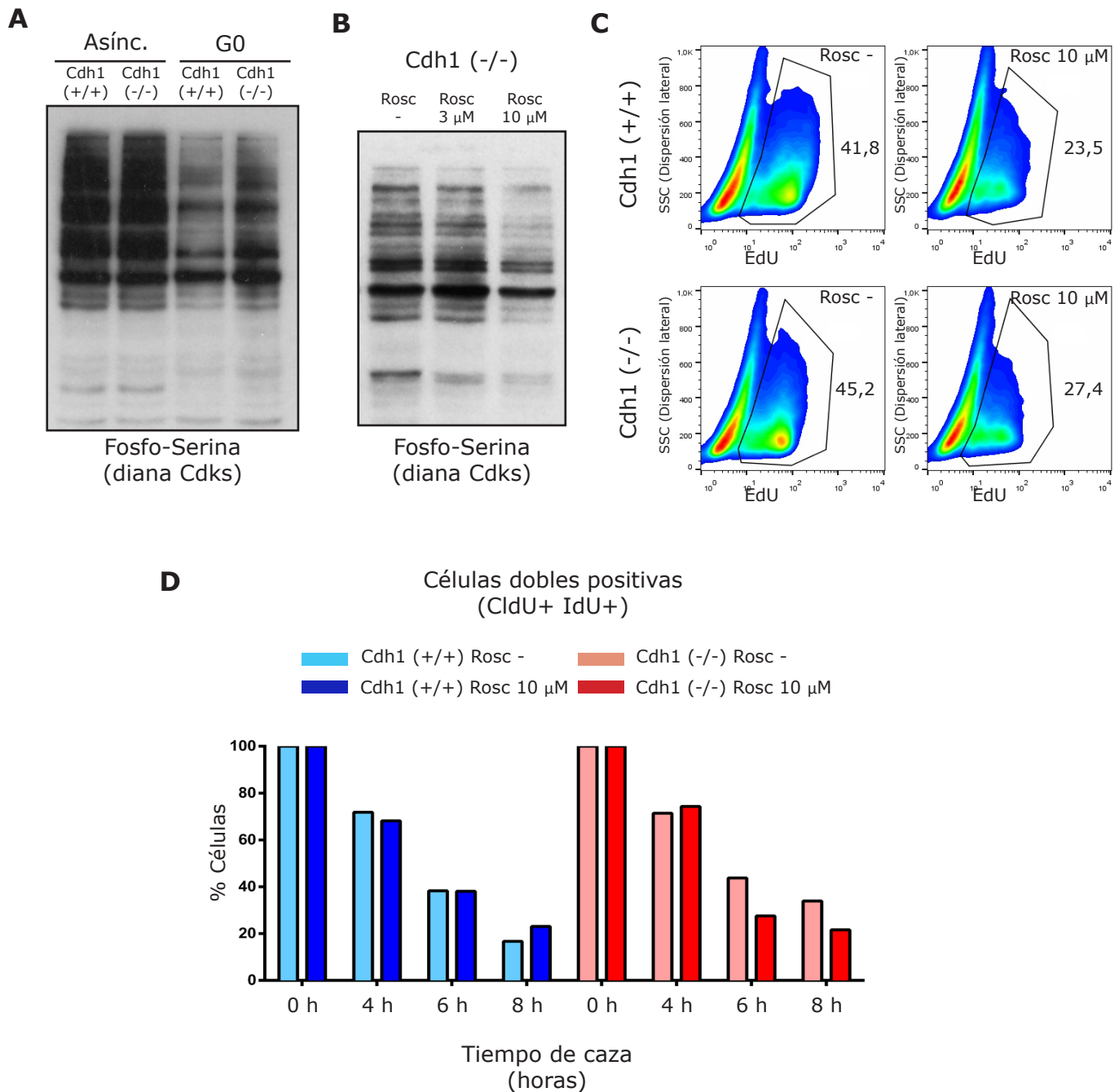


**Figura 33. Análisis de la dinámica de replicación en MEFs deficientes en Cdh1 y Skp2 mediante ensayos de fibras. A.** Velocidad de progresión de las horquillas en cultivos de MEFs control (gris), deficientes en Cdh1 (rojo), deficientes en Skp2 (azul), o deficientes en Cdh1 y Skp2 (verde). **B.** Datos de distancia entre orígenes de replicación contiguos en los cultivos indicados en A.

MEFs deficientes en Cdh1 tenía un efecto real sobre la extensión de la fase S, se llevaron a cabo ensayos de doble pulso con CldU e IdU en presencia de roscovitina a una concentración de 10  $\mu$ M. El análisis de los datos reveló una cierta tendencia en las células carentes de Cdh1 tratadas con roscovitina hacia el acortamiento de la fase de síntesis. Por el contrario, el tratamiento de las células control no produjo un efecto similar, y apenas modificó el porcentaje de dobles positivas para ambos análogos tras los distintos tiempos de caza, o en todo caso, lo aumentó ligeramente (**Fig. 34C**).

Estos resultados contradicen en cierta medida los extraídos del análisis de los MEFs con la doble mutación en Cdh1 y Skp2, y sugieren que el exceso de actividad Cdk presente en células carentes de Cdh1 sí podría contribuir a generar los defectos replicativos detectados en dichas células.

No obstante, somos conscientes de que este efecto de la roscovitina en los MEFs mutantes requiere un estudio más profundo para verificar si realmente la excesiva actividad Cdk en ausencia de Cdh1 colabora en la aparición del fenotipo de estrés replicativo exhibido por estas células.



**Figura 34. Efecto de la inhibición del exceso de actividad Cdk en células carentes de Cdh1.** **A.** Análisis por *Western Blot* de la presencia de residuos de Serina fosforilados por complejos Cdk, en lisados totales de MEFs control o deficientes en Cdh1 creciendo en cultivo asíncrono o sincronizados en G0. **B.** Análisis análogo al de A, pero con lisados de MEFs deficientes en Cdh1 no tratados o tratados con roscovitina 3  $\mu$ M o 10  $\mu$ M durante 12 horas. **C.** Se examinó el efecto del tratamiento con roscovitina (10  $\mu$ M) sobre la proliferación de las células control y mutantes por ensayos de detección de EdU por citometría de flujo. **D.** Estudio de la duración de la fase S por ensayos de pulso-caza-pulso con CldU e IdU. Se marcaron cultivos de MEFs control y mutantes con los dos análogos de la timidina en pulsos de 30 minutos intercalados por un tiempo de caza variable y tanto en presencia como en ausencia de roscovitina 10  $\mu$ M. Se identificaron y cuantificaron las células positivas para los dos análogos en los cuatro tipos de muestras y tras los tiempos de caza indicados.



# *Discusión*



## 1. Inestabilidad genómica

Las primeras evidencias de la importancia de APC/C-Cdh1 para el mantenimiento de la integridad genómica se obtuvieron en la levadura de gemación (*S. cerevisiae*) al generar un mutante *Cdh1Δ* en el que detectaron defectos en la segregación cromosómica que conducían a la pérdida de cromosomas enteros (Ross y Cohen-Fix, 2003). Más recientemente, se ha confirmado en ese mismo organismo que la mutación de *Cdh1* eleva la incidencia de reordenamientos cromosómicos (Ayuda-Durán *et al.*, 2014). En células de mamífero, fue la sobre-expresión del inhibidor de APC/C, Emi1, lo que aportó los primeros indicios de la relevancia de esta ubiquitina-ligasa para evitar la tetraploidización y el aumento de la incidencia de reordenamientos cromosómicos, al menos en células deficientes en p53 (Lehman *et al.*, 2006). Posteriormente, nuestro grupo generó un modelo de ratón knockout para *Cdh1*, que aunque resultó ser letal embrionario, permitió generar cultivos de MEFs deficientes en *Cdh1* e inmortalizarlos. En ellos se detectó una frecuencia anormalmente alta de células aneuploides (con ganancias y pérdidas de cromosomas) y con translocaciones cromosómicas complejas (García-Higuera *et al.*, 2008).

A raíz de estas observaciones quisimos profundizar en el fenotipo de inestabilidad genómica y comprobar si también en MEFs primarios la ausencia de *Cdh1* promovía la aparición de daño genotóxico y, en caso afirmativo, investigar el origen del mismo. Para ello empleamos dos tipos de cultivos de fibroblastos murinos, cultivos generados a partir de embriones en los que ya se ha producido la delección de *Cdh1* y que por tanto han llevado a cabo un número muy considerable de divisiones celulares en ausencia de la proteína, y cultivos generados a partir de embriones portadores del alelo condicional de *Cdh1* y en los cuales inducimos la delección aguda de *Cdh1* mediante infección con adenovirus que expresan la recombinasa Cre. Es importante mencionar que uno de los inconvenientes de este tipo de abordaje es la utilización de adenovirus para promover la escisión de los exones de *Cdh1*, ya que, la propia infección adenoviral desencadena una cierta respuesta celular y algo de genotoxicidad. Para intentar evitar esos problemas diseñamos otra estrategia para eliminar *Cdh1*, basada en la expresión del transgén CreERT2 bajo el promotor de la Ubiquitina (Ub-CreERT2). De este modo se consigue una expresión ubicua y continua de la recombinasa Cre fusionada al dominio de unión a ligando del receptor de estrógenos, que permanece retenida en el citoplasma, y por tanto inactiva, hasta que, en presencia de tamoxifeno (un ligando sintético del receptor) se induce su translocación al núcleo de la célula donde puede ejercer su acción recombinogénica. Sin embargo tras un número considerable de pruebas con distintas dosis, tiempos y estrategias de tratamiento con tamoxifeno no fuimos capaces de obtener, al menos en MEFs, una eficiencia en la delección de *Cdh1* comparable a la alcanzada con los adenovirus. Optamos, por tanto, por continuar con las infecciones adenovirales para inducir la delección de *Cdh1*, pero añadiendo

los controles adecuados para poder evaluar tanto los efectos derivados de la propia infección (MEFs infectados con adenovirus vacío) como los derivados de la expresión de la recombinasa (MEFs silvestres infectados con Adeno-Cre).

Tanto en los cultivos de MEFs constitutivamente deficientes en Cdh1 como en aquellos en los que se indujo la delección aguda de Cdh1 encontramos una mayor proporción de células positivas para  $\gamma$ H2AX, tanto por citometría de flujo como por microscopía de fluorescencia. Ciertamente es que se trata de un incremento moderado, pero resulta incuestionable que estamos ante un fenotipo consistente que se reproduce en ambos tipos de MEFs. El efecto, sin embargo, es algo más pronunciado en las células empobrecidas en Cdh1 por infección con Adeno-Cre, posiblemente, debido a que las células constitutivamente deficientes en la proteína han desarrollado mecanismos compensatorios para mitigar las consecuencias de la falta de Cdh1. Conviene mencionar que este mismo fenotipo de aumento de daño endógeno en ausencia de Cdh1 también se ha observado en cultivos primarios de progenitores neurales (neurosferas) (Eguren *et al.*, 2013) y en eritroblastos extraídos de hígado fetal (datos no publicados, Cuadrado M y García-Higuera I), por lo que cabe suponer que se trata de un fenómeno general que presumiblemente afectará por igual a la mayoría de tipos celulares.

Nuestros datos indican, además, que la presencia de daño es particularmente relevante en la población celular que no se encuentra en la fase S del ciclo celular (fracción de células negativas para EdU y positivas para  $\gamma$ H2AX). Sin embargo, como se deduce del experimento en el que monitorizamos la expresión de  $\gamma$ H2AX en el primer ciclo celular tras la delección de Cdh1, el paso por fase S es necesario para que se produzca daño. Es decir, que a pesar de que el complejo APC/C-Cdh1 actúa en G1, tras la pérdida de Cdh1 las lesiones en el DNA solo se producen si las células inician la replicación, y en ese caso no se manifiestan extensivamente hasta pasada la misma, cuando las células ya están en la fase G2 o incluso en mitosis. Esto ocurre con frecuencia en células que sufren estrés replicativo, ya que cuando el grueso del genoma ha sido ya replicado, las horquillas que permanecen bloqueadas o paradas, serán procesadas, antes de que la célula entre en mitosis, por endonucleasas que generarán roturas de doble cadena. Por otra parte, el estrés replicativo favorece la aparición de regiones incompletamente replicadas que producirán roturas durante la segregación cromosómica, es decir, durante la mitosis (Ichijima *et al.*, 2010; Burrell *et al.*, 2013; Wilhelm *et al.*, 2013). En ese sentido, el hecho de que los cultivos de MEFs deficientes o empobrecidos en Cdh1 acumulen células con focos de 53BP1, sugiere que, al menos en esas células, el daño en el DNA se estaría produciendo en mitosis, puesto que los focos nucleares de 53BP1 son característicos de células en fase G1 cuyas lesiones proceden de la fase mitótica anterior (Lukas *et al.*, 2010). Finalmente, los ensayos del cometa demuestran inequívocamente que las células que carecen de Cdh1 o que han visto significativamente reducida su expresión, sufren más roturas de cadena sencilla y/o de doble



cadena que las células control y presentan un genoma más fragmentado. Ningún estudio previo había aportado evidencias directas del aumento de la incidencia de roturas en el DNA en ausencia de este cofactor de APC/C.

El estrés replicativo también se ha relacionado normalmente con la aparición de micronúcleos (Xu *et al.*, 2011; Gelot *et al.*, 2015). Ahora bien, el estrés replicativo no siempre es la causa subyacente en la generación de estas estructuras, que surgen tras la mitosis y tienen su origen principal en la presencia de cromosomas retardados en anafase o en la existencia de fragmentos cromosómicos acéntricos (Fenech *et al.*, 2010). En nuestro caso, si bien se observa un incremento de micronúcleos tanto en los cultivos de MEFs deficientes en Cdh1 como en aquellos en los que inducimos la delección aguda de Cdh1, sólo en estos últimos las diferencias con los cultivos control resultaron estadísticamente significativas. Es posible que esto se deba al proceso de adaptación de los MEFs carentes de Cdh1 a la falta de la proteína. O bien podría reflejar la mayor variabilidad de los cultivos control y knockout para Cdh1, que, en definitiva, proceden de embriones diferentes y por lo tanto poseen una carga genética también diferente. En cambio, en el caso de los MEFs portadores del alelo condicional de Cdh1 e infectadas con Adeno-Cre o con un adenovirus control, comparamos la mismas células con mayor o menor expresión de Cdh1. En todo caso, también en cultivos de fibroblastos primarios humanos en los que la expresión de Cdh1 se suprimió mediante RNA interferente, se detectó un claro aumento de la presencia de micronúcleos (Engelbert *et al.*, 2007).

El aumento de daño en las células que no expresan o expresan niveles reducidos de Cdh1 va acompañado de una activación moderada de la ruta de respuesta a daño en el DNA, caracterizada por un discreto aumento de los niveles de p53, fosfo-p53 y fosfo-Chk1. Se trata probablemente de una respuesta proporcionada frente a un daño continuado pero de baja intensidad, que no compromete de manera importante la viabilidad celular a corto plazo pero favorece la acumulación de lesiones que ponen en riesgo la estabilidad genómica de los MEFs y muy posiblemente de otros tipos celulares tanto normales como tumorales. De hecho, la estabilización de p53 y el aumento de la expresión de p21 en respuesta a la supresión de Cdh1 mediante RNA interferente se ha observado también en fibroblastos humanos y en células U2Os (línea celular de osteosarcoma) (Engelbert *et al.*, 2008; Sigl *et al.*, 2009).

También in vivo se han obtenido evidencias de la importancia de Cdh1 para prevenir la aparición de daño endógeno. Así, estudios de nuestro grupo (Delgado-Esteban *et al.*, 2013, y datos no publicados de Myriam Cuadrado) y del grupo del Dr. Malumbres (Eguren *et al.*, 2013) han evidenciado una presencia incrementada de células positivas para  $\gamma$ H2AX, mayor expresión de p53 y elevados niveles de apoptosis en cerebro e hígado de embriones que no expresan Cdh1. Esto indica que las observaciones realizadas en MEFs primarios son fisiológicamente

relevantes y confirma la idoneidad de este sistema de estudio in vitro para profundizar en el papel fisiológico del complejo APC/C-Cdh1.

## 2. Defectos en la dinámica de replicación

El estrés replicativo se ha postulado como posible causa de la inestabilidad genética asociada a la pérdida de Cdh1 desde las primeras observaciones de este tipo realizadas en células de mamífero (Engelbert *et al.*, 2008; Sigl *et al.*, 2009; García-Higuera *et al.*, 2008). Sin embargo, al inicio de este trabajo, ningún estudio había evidenciado alteraciones en la dinámica de replicación que avalasen esta idea. Los datos que hemos obtenido realizando ensayos de fibras de DNA demuestran que, en efecto, tanto la ausencia como la expresión reducida de Cdh1 inducen estrés replicativo. Así, la velocidad de progresión de las horquillas se ve reducida entre un 15 y un 25% en MEFs deficientes o deplecionados en Cdh1 en relación a los correspondientes MEFs control. Y en células de hígado fetal, con una tasa de proliferación notablemente superior, la diferencia es aún mayor, obteniéndose valores un 35% más bajos en las células procedentes de embriones mutantes con respecto a las procedentes de embriones control. Por otra parte, la distancia media entre orígenes de replicación contiguos también se reduce significativamente en ausencia de Cdh1, indicando una activación incrementada de orígenes de replicación. Alteraciones similares en ambos parámetros replicativos han sido observadas previamente en otros modelos celulares de estrés replicativo. Es el caso, por ejemplo, de la sobre-expresión de ciclina E en líneas humanas (Jones *et al.*, 2012), de las células mutantes para Chk1 (Petermann *et al.*, 2006; Maya-Mendoza *et al.*, 2007) o de las células con alteraciones en el estado de acetilación de las histonas (Conti *et al.*, 2010). Además, en el caso de las células mutantes para Cdh1, el incremento en el disparo de orígenes no es capaz de compensar la ralentización de las horquillas replicativas, y la fase S se prolonga un 20% más en las células deficientes en Cdh1 que en las células control.

Un estudio reciente publicado durante la realización de este trabajo también detectó una reducción en la velocidad de progresión de las horquillas, en células HeLa empobrecidas en Cdh1 con siRNAs específicos (Yuan *et al.*, 2014). En este artículo, en el que analizan el papel de Cdh1 en la transición G1/S, atribuyen los defectos replicativos asociados a la pérdida de Cdh1, a la acumulación anticipada de ciclina E mediada por Rb/E2F, que induciría la entrada prematura en fase S. Los autores proponen, además, que la estabilización de Skp2, al restringir los niveles de p27, reduciría también la cantidad de complejos ciclina E-Cdk2 necesarios para

alcanzar el nivel de actividad Cdk2 requerido para iniciar la replicación. También nosotros hemos considerado la posible implicación de la ciclina E en las anomalías sufridas por las células carentes de Cdh1 y no descartamos que juegue algún papel en el fenotipo observado. Sin embargo, tras repetidos intentos, nunca hemos detectado una sobre-expresión de esta ciclina en MEFs deficientes en Cdh1. Otra discrepancia clara con nuestros datos es que en este trabajo no encuentran signos de daño en el DNA (expresión de  $\gamma$ H2AX, fosfo-Chk1, fosfo-Chk2). No sabemos a qué achacar estas diferencias, más allá de que se trata de sistemas celulares diferentes (fibroblastos primarios de ratón en nuestro caso, y una línea tumoral humana derivada de un tumor cervical en el suyo) que pueden resultar más o menos sensibles a la reducción de los niveles de Cdh1.

Se ha demostrado que la velocidad de avance de las horquillas es inversamente proporcional a la frecuencia de activación de orígenes en una región localizada del genoma. Esto es, cuanto menor es el número de orígenes disparados más rápido avanza la horquilla para tratar de compensar y replicar la misma región en el mismo tiempo; y viceversa, a mayor activación de orígenes, menor la velocidad de progresión de las horquillas (Zhong *et al.*, 2013). Sin embargo, en el caso de las células deficientes en Cdh1, gracias al tratamiento con PHA-767491, el inhibidor químico de la quinasa Cdc7, hemos comprobado que la ralentización de las horquillas no se debe al aumento de orígenes activos en una zona concreta, sino que está causada por un defecto primario que compromete la síntesis eficiente del DNA. En otros casos de estrés replicativo en los que ambos parámetros están afectados de manera similar al nuestro, el tratamiento con PHA, sí normaliza la velocidad de las horquillas. Es lo que ocurre, por ejemplo, cuando se sobre-expresa ciclina E, ya que la alteración primaria es la hiper-activación de orígenes y la ralentización de las horquillas es un efecto secundario debido, por una parte, al agotamiento de precursores replicativos, y por otra, a un aumento de las colisiones entre la maquinaria replicativa y la de transcripción (Jones *et al.*, 2012).

### 3. Corrección del fenotipo de estrés replicativo mediante la adición de dNTPs

En cuanto al defecto primario que podría comprometer el avance de las horquillas replicativas en MEFS deficientes o empobrecidos en Cdh1, hemos comprobado que la adición de nucleótidos exógenos logra restablecer una velocidad de progresión de las horquillas similar a la de las células control, sugiriendo una limitada disponibilidad de dNTPs en estas células. Por tanto, la ausencia de Cdh1 estaría alterando los mecanismos de homeostasis de las reservas

intracelulares de dNTPs o bien generando alguna otra situación que requiera un aporte adicional de nucleótidos para mantener una correcta progresión de los replisomas.

El uso de nucleótidos para tratar de corregir defectos replicativos es un tanto controvertido, ya que mayoritariamente se acepta que la membrana plasmática es impermeable a los dNTPs debido a las cargas negativas de sus grupos fosfato. Sin embargo, existen varios estudios en los que, suplementando el medio de cultivo de las células con dNTPs, se ha conseguido revertir con éxito el crecimiento lento de dichas células (Gaglio *et al.*, 2009; Jones *et al.*, 2011; Besse *et al.*, 2015). En todo caso, hemos reproducido la mayoría de resultados empleando mezclas de nucleósidos, si bien es cierto que con idénticas concentraciones de dNTPs y nucleósidos (10  $\mu$ M), el rescate del fenotipo parece ser más completo con los primeros. Esto podría deberse o bien a que los dNTPs penetran al interior de estas células en mayor medida de lo esperado, o bien, quizás, a que en los MEFs carentes de Cdh1, el proceso de fosforilación de los nucleósidos para dar lugar a dNTPs resulta poco eficiente. Por otro lado, también hay que tener en cuenta que en el grueso de los trabajos recientes en los que se hace uso de mezclas de nucleósidos para rescatar defectos proliferativos, se utilizan concentraciones hasta 6 veces superiores a las empleadas en este trabajo. Actualmente estamos realizando experimentos con concentraciones superiores de nucleósidos para verificar si la recuperación de las deficiencias replicativas llega a ser completa.

El aporte externo de dNTPs o nucleósidos también consigue aumentar la distancia entre orígenes de replicación contiguos en los MEFs deficientes o empobrecidos en Cdh1, lo que confirma que el exceso de activación de orígenes en estas células está relacionado con la ralentización de las horquillas y muy probablemente se deba a una activación compensatoria de orígenes durmientes. Así ocurre por ejemplo en células tratadas con hidroxiaurea, en las que se observa una reducción de la distancia entre orígenes debida a una hiperactivación compensatoria de los mismos (Ge *et al.*, 2007; Poli *et al.*, 2012).

En los últimos tiempos son abundantes los trabajos en los que la adición exógena de nucleósidos ha logrado corregir fenotipos de daño y estrés replicativo en diversas células con problemas relacionados con la duplicación del DNA (Bester *et al.*, 2011; Burrell *et al.*, 2013; Manning *et al.*, 2014; Lopez-Contreras *et al.*, 2015), remarcando la importancia del control estricto de las concentraciones de dNTPs en el entorno de las horquillas. En el caso de los MEFs deficientes en Cdh1, aunque la recuperación de los niveles de daño endógeno tras el tratamiento con dNTPs/nucleósidos no resulta completa, y no se alcanzan los valores de las células silvestres, sí resulta palpable una mejoría del fenotipo de daño. Esto demuestra que, tal y como se pensaba, la inestabilidad genómica detectada en ausencia del cofactor de APC/C, tiene su origen, al menos en parte, en los defectos replicativos.

#### 4. Origen del problema: reservas intracelulares de dNTPs

Con los datos del rescate de los defectos en replicación tras el tratamiento con nucleótidos sobre la mesa, esperábamos hallar consecuentemente algún tipo de anomalía en la cuantificación de los niveles intracelulares de dNTPs. Sin embargo, solo se observan diferencias marginales entre las células control y las deficientes en Cdh1, independientemente del criterio de normalización utilizado para procesar los datos. ¿Por qué no somos capaces de ver diferencias más evidentes si todo apunta a que la disponibilidad de dNTPs está limitada en ausencia de Cdh1? Varias son las posibles explicaciones que nos planteamos.

En primer lugar, es posible que incluso en células silvestres la concentración intracelular de dNTPs sea limitante y cambios tan discretos como los detectados en los MEFs carentes de Cdh1 podrían ser suficientes para comprometer la eficiencia de la replicación. En levaduras se ha comprobado que al aumentar la actividad de la ribonucleótido reductasa (por mutación de un inhibidor o por sobre-expresión de la subunidad catalítica RRM1) y, en consecuencia, el nivel intracelular de dNTPs, se incrementa significativamente la velocidad de progresión de las horquillas replicativas y se disminuye la duración de la fase S (Poli *et al.*, 2012). Esto demuestra que, al menos en ese organismo, el nivel fisiológico de dNTPs resulta limitante para la replicación del genoma.

En segundo lugar, puede que la disminución en los niveles de dNTPs sea exclusivamente local, es decir, que esté restringida al entorno físico de las horquillas de replicación activas. En ese caso, dado que la cuantificación se realiza sobre un extracto total de células, las diferencias en las cantidades disponibles en las proximidades del replisoma podrían resultar indetectables.

En tercer lugar, puede que realmente exista un descenso global de los niveles de dNTPs en los MEFs carentes de Cdh1, pero que el método de cuantificación no sea lo suficientemente sensible para detectar cambios moderados en la concentración de cada uno de los nucleótidos. Apoyando esta teoría, en un trabajo reciente en el que se generó un modelo de ratón con copias génicas extra de RRM2, tampoco fueron capaces de detectar un incremento significativo de dNTPs en los correspondientes MEFs utilizando un método similar de cuantificación de nucleótidos intracelulares (cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas). A pesar de ello, las células mostraron evidencias claras de resistencia a hidroxiaurea y, por tanto, una actividad RNR incrementada (Lopez-Contreras *et al.*, 2015).

Y por último, la explicación menos ortodoxa nos invitaría a pensar que la concentración intracelular de dNTPs no se altera en ausencia de Cdh1 y el efecto de la adición de nucleótidos o nucleósidos exógenos a las células mutantes es indirecto. En un trabajo publicado

recientemente (Manning *et al.*, 2014), fibroblastos humanos desprovistos de Rb muestran defectos replicativos muy similares a los detectados en células deficientes en Cdh1, que también se corrigen con nucleósidos exógenos. Sin embargo, estas células no presentan niveles reducidos de dNTPs intracelulares sino más bien al contrario, niveles muy superiores a los de las células control. Por otra parte, los autores demuestran que la ausencia de Rb produce en estas células defectos de cohesión, y argumentan que el tratamiento con nucleósidos mejora la cohesión cromosómica y esto, a su vez, incrementa la eficiencia de la replicación. El papel de la cohesina regulando la organización espacial de la cromatina durante la replicación, y controlando la activación de orígenes, ya había sido descrito con anterioridad (Guillou *et al.*, 2010). Lo que resulta un poco más difícil de comprender es el vínculo entre la adición de nucleósidos y el aumento de la cohesión. Con todo, y aunque no tenemos evidencias de que la cohesión cromosómica esté alterada en ausencia de Cdh1, es una posibilidad que no podemos descartar y que habrá que explorar con más detalle.

## 5. Desregulación de enzimas implicadas en las rutas de síntesis de dNTPs

Aunque a día de hoy debemos considerar todas las hipótesis planteadas en los párrafos precedentes, el hecho de que tres enzimas implicadas en las rutas de síntesis de dNTPs estén desreguladas en ausencia de Cdh1, sugiere que la homeostasis de los nucleótidos intracelulares podría estar alterada en células carentes de Cdh1.

El efecto más patente de la falta de Cdh1 es sobre la subunidad reguladora de la ribonucleótido reductasa (RRM2). Es cierto que la estabilización de RRM2 invita a pensar en una síntesis al alza de dNTPs y no al contrario. De hecho, en MEFs deficientes en Cdh1 sincronizados en G0 y durante la primera fase G1 tras la re-entrada en ciclo, detectamos niveles de dNTPs superiores a los de MEFs control. Sin embargo, la sobre-expresión de la subunidad pequeña ha sido vinculada a desequilibrios en los niveles relativos de los cuatro dNTPs tanto en células en cultivo como in vivo, en modelos de ratón (D'Angiolella *et al.*, 2012; Ylikallio *et al.*, 2010). Esta situación puede resultar tan nociva como una caída generalizada de los mismos, especialmente si uno de los dNTPs se reduce por debajo de los niveles fisiológicos necesarios para garantizar una replicación eficiente del genoma. Se ha comprobado, además, que el desequilibrio en las cantidades relativas de dNTPs produce inestabilidad genética al aumentar la frecuencia de mutaciones espontáneas (D'Angiolella *et al.*, 2012; Ylikallio *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2008).

Retornando a lo que sucede en las células mutantes para *Cdh1*, otra posibilidad es que los niveles elevados de dNTPs en G0/G1 favorezcan el inicio prematuro de la fase S pero no perduren durante la fase replicativa. De hecho, la expresión de RRM2 tiende a normalizarse en fase S, lo que sugiere un mecanismo compensatorio que podría atenuar la transcripción y/o traducción de RRM2 para evitar precisamente un aumento excesivo de actividad ribonucleótido reductasa. En ese sentido contamos con datos preliminares que indican que el nivel de la subunidad catalítica RRM1 está disminuido en fase S, en cultivos de MEFs sincronizados deficientes en *Cdh1*, con respecto a cultivos equivalentes de MEFs control. Por tanto, en conjunto, la actividad RNR durante la fase replicativa podría ser menor en células que no expresan *Cdh1* que en las que sí lo expresan; y en consecuencia, las primeras podrían sufrir un déficit de dNTPs durante el proceso de duplicación del genoma.

En el trabajo de Lopez-Contreras *et al.* (2015) mencionado anteriormente, el aumento de la dosis génica de RRM2 en ratón, alivia el estrés replicativo inducido por la inhibición química de ATR o bien por la expresión de alelos hipomórficos de la quinasa (alelos Seckel). Pero además, mejora significativamente la supervivencia de los animales portadores de los citados alelos de *Atr*, que sufren un proceso de envejecimiento acelerado y mueren prematuramente (Murga *et al.*, 2009). Esta observación parece difícilmente compatible con la hipótesis de que la estabilización de RRM2 por la falta de *Cdh1* pudiera contribuir a generar el fenotipo de estrés replicativo asociado a la deficiencia en el cofactor de APC/C. Sin embargo, es importante precisar que los alelos extra de RRM2 están sujetos a los mismos controles transcripcionales y post-transcripcionales que los alelos “normales” de RRM2, y por lo tanto muestran el mismo patrón de expresión que estos y se degradan en el mismo momento. En cambio, en los mutantes de *Cdh1*, el patrón de expresión de RRM2 es diferente, puesto que se suaviza la fluctuación de los niveles de proteína a lo largo del ciclo, que en células control son mínimos en G1 y máximos en fase S. La delección de *Cdh1* en células portadoras de copias extra de RRM2 nos permitiría evaluar si el estrés replicativo inducido por la pérdida de *Cdh1* también se corrige incrementando la expresión de RRM2 más allá de G1. Del mismo modo, resultaría informativo expresar una forma estable de RRM2 (no reconocible por APC/C-*Cdh1*) en células control para evaluar la importancia fisiológica de la oscilación de los niveles de RRM2 en G1 y S y su contribución a la prevención del estrés replicativo.

En cuanto a los otros dos sustratos de APC/C-*Cdh1* que participan en las rutas de síntesis de nucleótidos, la timidina quinasa (TK1) y la timidilato quinasa (TMPK), consideramos que su influencia en las reservas de dNTPs de las células deficientes en *Cdh1* y por ende, en el fenotipo de estrés replicativo, podría estar parcialmente eclipsada por la acumulación de RRM2. Las dos enzimas de la vía de rescate muestran un aumento moderado de la expresión en G0/G1 y de nuevo (no mostrado en Resultados) una normalización de los niveles en fase S. Se ha



comprobado que la expresión combinada en fibroblastos murinos inmortalizados (NIH-3T3) de formas no degradables por APC/C-Cdh1 de ambas enzimas induce un importante desequilibrio en las reservas intracelulares de dNTPs (Ke *et al.*, 2005). Sin embargo, el nivel de expresión de ambas enzimas alcanzado en dichas células es muy superior al detectado en MEFs primarios deficientes en Cdh1, que muy probablemente resulte insuficiente para generar desequilibrios cuantitativamente relevantes .

Otro de los sustratos de APC/C-Cdh1 cuya desregulación podría tener implicaciones en las reservas intracelulares de dNTPs es la enzima metabólica PFKFB3, que favorece la vía glucolítica de aprovechamiento de la glucosa en detrimento de la ruta de las pentosas fosfato (Almeida *et al.*, 2010; Colombo *et al.*, 2010). Esta última genera poder reductor y precursores para la síntesis de nucleótidos (anillo de ribosa). Por lo tanto, la estabilización de PFKFB3 por la falta de Cdh1 podría comprometer el aporte de dichos precursores y, por extensión, la síntesis de dNTPs. Sin embargo, no tenemos datos sobre el nivel de expresión de PFKFB3 en MEFs carentes de Cdh1, y por tanto desconocemos si efectivamente está desregulada en estas células. En todo caso, podría resultar interesante expresar en MEFs una versión no degradable de la enzima para valorar el impacto que podría tener sobre la eficiencia de la replicación.

La estabilización de Glis1 (glutaminasa-1), otro de los sustratos de APC/C-Cdh1, también podría tener un efecto sobre la síntesis de dNTPs (Colombo *et al.*, 2010). Su acumulación promovería la utilización de glutamina para la producción de lactato y energía, limitando su contribución a la biosíntesis de dNTPs como molécula donadora de nitrógeno. Estas dos enzimas constituyen una buena muestra de cómo APC/C-Cdh1 podría estar regulando la disponibilidad de nucleótidos de manera más indirecta, a través del control de dos metabolitos primarios como son la glucosa y la glutamina. Ahora bien, ¿realmente la ausencia de Cdh1 generaría un cambio en el metabolismo energético tan relevante como para afectar de manera sustancial a la síntesis de nucleótidos o simplemente supondría un grano de arena más que se sumaría a los efectos derivados de la estabilización de otros sustratos? Es una cuestión que dejamos abierta pero que abre una vía de investigación interesante para comprender mejor el papel de APC/C-Cdh1 en relación al metabolismo celular.



## 6. Papel del exceso de actividad Cdk sobre los defectos replicativos

### 6.1. Licenciamiento de orígenes

En levaduras, está demostrado que la actividad Cdk inhibe el licenciamiento de orígenes (Dahman *et al.*, 1995; Detweiler y Li, 1998; Diffley, 2004). Este mecanismo de control parece estar conservado en *Xenopus* y en mamíferos (Ekholm-Reed *et al.*, 2004; Woo y Poon, 2003), si bien en estos últimos existen mecanismos adicionales de regulación como los mediados por geminina.

La influencia de los reguladores de Cdks, Cdh1 y Sic1 (ortólogo de p27) sobre el uso de orígenes de replicación concretos ha sido estudiada recientemente en *S. cerevisiae* (Ayuda-Durán *et al.*, 2014). Según este trabajo, ambos reguladores son necesarios para una activación de orígenes eficiente, si bien no todos los orígenes de replicación analizados presentan la misma sensibilidad a la pérdida de Cdh1 y/o Sic1 (el ortólogo de p27). Además, los defectos replicativos de las células *Cdh1Δ* se corrigen al incrementar la expresión de Sic1, sugiriendo que, al menos en este organismo, dichos defectos estarían relacionados con la desregulación e la actividad Cdk.

Teniendo en cuenta lo anterior y que ya se había comprobado previamente que la ausencia de Cdh1 conlleva un incremento de la actividad Cdk1 y Cdk2 en MEFs (García-Higuera *et al.*, 2008), a priori esperábamos encontrar alguna deficiencia en la formación de los complejos pre-replicativos en las células deficientes o empobrecidas en el cofactor de APC/C. Sin embargo, este no fue el caso, ya que hallamos una carga incrementada de Cdc6 y Cdt1 en cromatina en células mutantes sincronizadas en G0 y, tras la re-entrada en ciclo, una cinética acelerada de unión a cromatina de distintos componentes del complejo pre-replicativo. Lo más sorprendente de este resultado es que no concuerda con los datos previos de nuestro grupo en MEFs inmortalizados deficientes en Cdh1 (García-Higuera *et al.*, 2008), en los que, con un abordaje experimental análogo, sí se detectó una disminución en la carga de MCM4 y MCM5 en cromatina. A día de hoy no tenemos una explicación razonable para esta discrepancia, más allá de las diferencias propias del sistema celular: MEFs inmortales en un caso (y por tanto con mutaciones adquiridas en la ruta de Rb o de p53) y MEFs primarios en el otro. Es difícil pensar que esa sea la causa del problema, pero tampoco podemos descartarlo. También es posible que todo se deba a una cierta variabilidad propia del diseño experimental, que podría enmascarar diferencias de pequeña intensidad.

También es importante tener en cuenta que el proceso de licenciamiento en un ciclo normal no es exactamente equiparable al que ocurre durante la re-entrada en ciclo tras un periodo de

quiescencia. El primero ocurre al final de la mitosis (Méndez y Stillman, 2000) y en ese caso la actividad Cdk relevante sería la actividad Cdk1, que muy probablemente estará desregulada en mayor o menor grado en ausencia de Cdh1, por estabilización de las ciclinas A y B. En cambio, tras la re-entrada en ciclo, el licenciamiento se produce en G1, mucho más cerca del inicio de la fase S, y en él juega un papel crucial la actividad ciclina E-Cdk2 (Mailand y Diffley, 2005). Así, en células control sincronizadas en G0 la actividad de APC/C-Cdh1 impide la formación de los complejos pre-replicativos, fundamentalmente a través de la degradación de Cdc6. Una vez inducida la re-entrada en ciclo, cuando las células avanzan a lo largo de G1 y se aproximan a la fase de replicación, los complejos ciclina E-Cdk2 fosforilan a Cdc6 y evitan su degradación proteolítica mediada por la E3 ubiquitina ligasa, permitiendo así su unión a los orígenes. En cambio, en las células que carecen de Cdh1, la ausencia del cofactor evitaría la degradación de Cdc6 en G0, y posibilitaría su estabilización en cromatina, favoreciendo así, tal vez, el licenciamiento de orígenes. Sin embargo, es posible que si pudiéramos analizar el licenciamiento de orígenes en células deficientes en Cdh1 en un ciclo normal, y no tras la re-entrada en ciclo, tal vez sí detectaríamos una cierta inhibición del proceso. Una manera de abordarlo sería sincronizar células en metafase con nocodazol y realizar fraccionamientos de muestras recogidas tras la liberación del bloqueo. Sin embargo, los tratamientos con nocodazol resultan muy poco efectivos en MEFs primarios, lo que dificulta enormemente este tipo de aproximación experimental.

Alternativamente, es posible que la formación de complejos pre-replicativos en cromatina tampoco esté disminuida en un ciclo proliferativo normal en ausencia de Cdh1. A esto contribuiría, en primer lugar, el hecho de que tanto Cdc6 como Cdt1 se encuentran entre los sustratos de APC/C-Cdh1 (Petersen *et al.*, 2000; Sugimoto *et al.*, 2008), lo cual promovería su estabilización en las células que no expresan Cdh1. En relación a Cdt1, la situación es un poco más compleja. Si tenemos en cuenta que la geminina, sustrato de Cdh1, actúa como inhibidor de Cdt1, uno esperaría que cuando se produce la pérdida del cofactor de APC/C los niveles de Cdt1 en cromatina fuesen más bajos. Por otra parte, también se ha comprobado que geminina puede actuar como protector de la degradación de Cdt1, permitiendo su acumulación en mitosis (Ballabeni *et al.*, 2004). No obstante, al respecto conviene mencionar que geminina no solo ha sido descrita como sustrato de APC/C-Cdh1, sino también de APC/C-Cdc20 (McGarry y Kirschner, 1998). De este modo se restringiría el licenciamiento de orígenes en células proliferantes a una estrecha ventana temporal entre metafase, cuando APC/C-Cdc20 empezaría a inducir la degradación de geminina, y anafase, cuando APC/C-Cdh1 comenzaría a ubiquitilar a Cdc6 (Clijsters *et al.*, 2013). Teniendo esto en cuenta, no es descabellado especular que en células deficientes en Cdh1, el complejo APC/C-Cdc20 podría estar supliendo, al menos parcialmente, la falta de Cdh1, ya que el propio Cdc20 escaparía a la degradación y podría mantenerse activo más allá de la anafase mitótica. Por una parte APC/C-Cdc20 limitaría la

estabilización de geminina, lo que facilitaría la unión de Cdt1 a los complejos pre-replicativos. Y por otra, actuando sobre las ciclinas mitóticas A y B, también contribuiría a restringir la actividad Cdk a la salida de mitosis, lo que podría facilitar la carga de las MCMs a cromatina.

## 6.2. Activación de factorías de replicación y disparo de orígenes

Al margen de su papel inhibitorio sobre el licenciamiento de orígenes en la transición mitosis/G1, la actividad Cdk (Cdk2-Ciclina E, Cdk2-Ciclina A y Cdk1-Ciclina A) juega un papel crucial en la transición G1/S y en el proceso de replicación. La fosforilación mediada por Cdks, como ya se mencionó en la Introducción, es necesaria para la activación de RecQL4 y treslina (ortólogos de las proteínas Sld2 y Sld3 de levaduras), evento indispensable para que se produzca la carga de Cdc45 sobre los orígenes y se inicie la replicación. Aunque normalmente se ha asignado esta función en la activación de orígenes a los complejos ciclina E-Cdk2, trabajos realizados con extractos de *Xenopus* también demostraron que Cdk1 colabora en este proceso de inicio de la replicación promoviendo la eficiencia en el disparo de orígenes (Krasinska *et al.*, 2008). Adicionalmente, en un trabajo con células de mamífero, se vio que Cdk2 parece ser importante principalmente para la activación de orígenes tempranos, mientras que Cdk1 determina la eficiencia de activación de orígenes tardíos (Katsuno *et al.*, 2009). Se ha descrito, además, que cambios modestos en la actividad Cdk pueden alterar el número de factorías de replicación activas (elevándolo si aumenta la actividad Cdk y reduciéndolo si disminuye), sin afectar de manera significativa a la distribución de orígenes dentro de cada factoría (Thomson *et al.*, 2010). Es posible, por lo tanto, que las células deficientes en Cdh1, debido al exceso de actividad Cdk1 y Cdk2, muestren a lo largo de la replicación mayor número de factorías replicativas activas que las células control. Este aumento de factorías, en una situación en la que las reservas de dNTPs estarían reducidas (como la que parece generarse en ausencia de Cdh1), limitaría aun más la disponibilidad de nucleótidos para la síntesis del DNA, puesto que al tener que distribuirse en torno a un mayor número de grupos de horquillas, se reduciría la concentración local de los mismos. Esto provocaría una ralentización aún más acusada de las horquillas replicativas y, en definitiva, un aumento de la longitud de la fase S (que es precisamente lo que detectamos en MEFs carentes de Cdh1).

Nuestros datos indican que la ausencia de Skp2 no corrige los defectos replicativos ni tampoco la inestabilidad genómica asociados a la deficiencia en Cdh1. Por contra, el tratamiento de MEFs carentes de Cdh1 con roscovitina, parece acortar moderadamente la duración de la fase

replicativa, mientras que el mismo tratamiento aplicado sobre MEFs control no modifica o, en todo caso, extiende ligeramente la duración de la fase S. Estos resultados aparentemente contradictorios podrían no serlo. La delección de Skp2 induce una notable sobre-expresión de p27, lo que debería inhibir tanto la actividad Cdk1 como la actividad Cdk2. Sin embargo, la falta de Skp2 promueve, además, la estabilización de ciclina E, lo que contrarresta en cierta medida el efecto inhibitorio de p27 sobre Cdk2, y facilita la replicación del genoma. En cambio, la inhibición de Cdk1 condiciona la entrada en mitosis de estas células. Prueba de ello es que los cultivos de MEFs deficientes en Skp2 acumulan células poliploides y con núcleos agrandados, como consecuencia de replications sucesivas no intercaladas por mitosis y divisiones celulares (Nakayama *et al.*, 2000). Es posible, por lo tanto, que en las células doblemente deficientes en Cdh1 y Skp2, la actividad Cdk2 esté mínimamente afectada y la replicación se desarrolle con una dinámica similar a la de los MEFs mutantes para Cdh1, condicionada por la limitada disponibilidad de dNTPs. Por el contrario, el tratamiento con roscovitina inhibe tanto Cdk1 como Cdk2, lo que podría reducir el número de factorías replicativas. Por lo tanto, en una célula control el tratamiento con roscovitina podría ocasionar que la replicación completa del genoma requiriese más tiempo. En cambio, en una célula deficiente en Cdh1 el mismo tratamiento podría provocar el efecto contrario, es decir un acortamiento parcial de la fase S, al reducirse la demanda de dNTPs y aumentar la disponibilidad de nucleótidos para las horquillas activas. De ser así, tras el tratamiento con roscovitina detectaríamos en estas células un aumento parcial de la velocidad de avance de las horquillas y posiblemente también de la distancia entre orígenes contiguos. ¿Por qué, entonces, no se observa el mismo efecto al reducir el disparo de orígenes inhibiendo Cdc7 con PHA-767491? Una posible explicación es que este tratamiento solo afectaría al disparo de orígenes dentro de cada factoría, pero no alteraría el número de factorías que se encuentran sintetizando DNA en la totalidad del núcleo. Y aunque la demanda de dNTPs en cada factoría sería menor, la diferencia podría no ser lo suficientemente importante como para alterar significativamente la concentración local de nucleótidos.

Sería interesante determinar si, como pensamos, la actividad Cdk2 remanente en las células doblemente deficientes en Cdh1 y Skp2 es la responsable de la ausencia de rescate de los defectos replicativos. Para ello, podríamos emplear un inhibidor específico de Cdk2 o bien, reducir la expresión de ciclina E con siRNAs específicos. Alternativamente, nos planteamos realizar tratamientos en MEFs deficientes en Cdh1 con RO-3306, inhibidor selectivo de los complejos ciclina A-Cdk1 y ciclina B1-Cdk1, en las mismas condiciones que los efectuados con roscovitina, para comprobar si, al inhibir exclusivamente Cdk1, pero no Cdk2, persisten los problemas en la dinámica de replicación.

De cualquier forma, los datos con los que contamos en relación a la influencia del exceso de actividad Cdk sobre los defectos replicativos en los MEFs carentes de Cdh1 son aún

preliminares. Tendremos que efectuar más experimentos para determinar si efectivamente los problemas relacionados con replicación en ausencia de Cdh1 son el resultado de la combinación de alteraciones ligadas a la homeostasis de los nucleótidos y a la desregulación de la actividad Cdk, o por el contrario dependen exclusivamente de una de las causas anteriores. En todo caso, contamos con las herramientas adecuadas para plantear y testar hipótesis de trabajo que nos permitan esclarecer el origen molecular de los fenotipos celulares asociados a la pérdida de Cdh1.

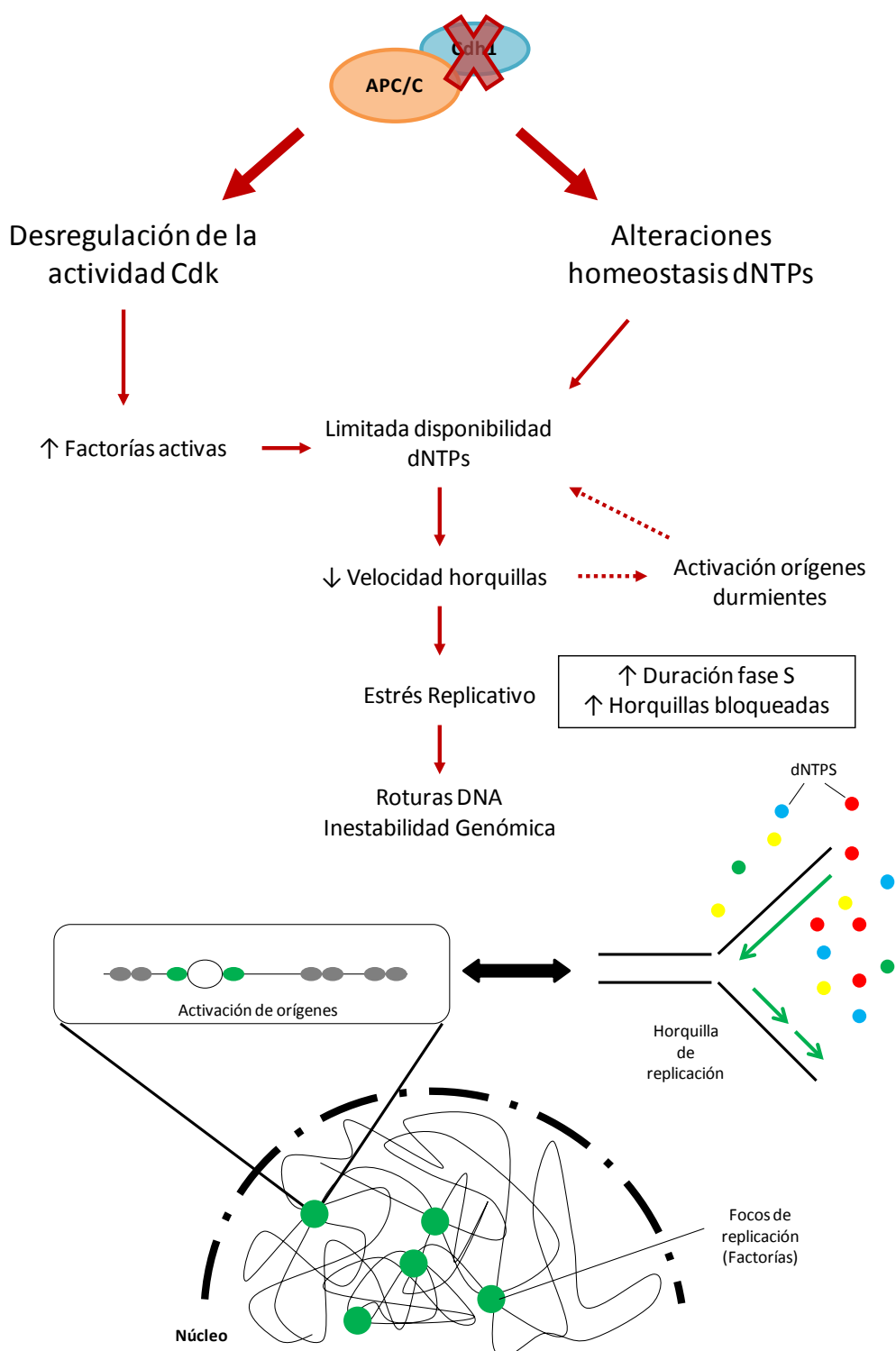


Figura Discusión. Modelo propuesto en relación a los defectos descritos en ausencia de Cdh1.





# *Conclusiones*





- 1.** La falta de Cdh1 en MEFs primarios provoca roturas espontáneas en el DNA. Dichas roturas se producen en G2 o durante la mitosis y únicamente si las células atraviesan la fase S en ausencia de Cdh1.
- 2.** Como consecuencia de la ausencia o pérdida de Cdh1 se produce una moderada activación de la ruta de respuesta a daño, con un aumento discreto de los niveles de p53, fosfo-p53 y fosfo-Chk1.
- 3.** Los MEFs carentes o deplecionados de Cdh1 sufren estrés replicativo, y muestran una reducida velocidad de progresión de las horquillas y una activación de orígenes incrementada.
- 4.** La ralentización de las horquillas replicativas en ausencia de Cdh1 es independiente de la eficiencia de activación de orígenes y se corrige con dNTPs/nucleósidos exógenos.
- 5.** La lenta progresión de las horquillas replicativas provoca la activación compensatoria de orígenes durmientes.
- 6.** La corrección de los defectos replicativos revierte, al menos parcialmente, los signos de daño endógeno, sugiriendo una relación causa-efecto entre ambas anomalías.
- 7.** APC/C-Cdh1 es necesario para mantener bajos en G0 y G1 los niveles de la subunidad pequeña de la ribonucleótido reductasa (RRM2) y, en menor medida, de la timidina quinasa (TK1) y de la timidilato quinasa (TMPK).
- 8.** El exceso de actividad Cdk en las células deficientes en Cdh1 parece condicionar el grado de activación de las factorías replicativas, agravando la ya de por sí limitada disponibilidad de nucleótidos en las proximidades de la horquilla y contribuyendo a la mayor duración de la fase S en ausencia de Cdh1.



A decorative graphic consisting of a grid of thick black lines on a white background. The grid is composed of two vertical lines and two horizontal lines, creating a 3x3 grid of squares. The lines are of varying thickness, with the central square being the largest and the outer squares being smaller.

# *Bibliografía*



**Aguilera A, García-Muse T (2012).** R loops: from transcription byproducts to threats to genome stability. *Molec Cell* 46(2), 115-124.

**Aird KM, Zhang R (2015).** Nucleotide metabolism, oncogene-induced senescence and cancer. *Cancer Lett* 356(2 Pt A), 204-210.

**Aird KM, Zhang G, Li H, Tu Z, Bitler BG, Garipov A, Wu H, Wei Z, Wagner SN, Herlyn M, Zhang R (2013).** Suppression of nucleotide metabolism underlies the establishment and maintenance of oncogene-induced senescence. *Cell Rep* 3(4), 1252-1265.

**Alabert C, Groth A (2012).** Chromatin replication and epigenome maintenance. *Nat Rev Cell Biol* 13(3), 153-167.

**Allen C, Ashley AK, Hromas R, Nickoloff JA (2011).** More forks on the road to replication stress recovery. *J Mol Cell Biol* 3(1), 4-12.

**Almeida A, Bolaños JP, Moncada S (2010).** E3 ubiquitin ligase APC/C-Cdh1 accounts for the Warburg effect by linking glycolysis to cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci USA* 107(2), 738-741.

**Almeida A, Bolaños JP, Moreno S (2005).** Cdh1/Hct1-APC is essential for the survival of postmitotic neurons. *J Neurosci* 25(36), 8115-8121.

**Altman AL, Fanning E (2004).** Defined sequence modules and an architectural element cooperate to promote initiation at an ectopic mammalian chromosomal replication origin. *Mol Cell Biol* 24(10), 4138-4150.

**Alver RC, Chadha GS, Blow J (2014).** The contribution of dormant origins to genome stability: From cell biology to human genetics. *DNA Repair* 19, 182-189.

**Anand S, Penrhyn-Lowe S, Venkitaraman AR (2003).** AURORA-A amplification overrides the mitotic spindle assembly checkpoint, inducing resistance to Taxol. *Cancer Cell* 3(1), 51-62.

**Anglana M, Apiou F, Bensimon A, Debatisse M (2003).** Dynamics of DNA replication in mammalian somatic cells: nucleotide pool modulates origin choice and interorigin spacing. *Cell* 114(3), 385-394.

**Aparicio T, Ibarra A, Méndez J (2006).** Cdc45-MCM-GINS, a new power player for DNA replication. *Cell Div* 1, 18.

**Arlt MF, Durkin SG, Ragland RL, Glover TW (2006).** Common fragile sites as targets for chromosome rearrangements. *DNA Repair* 5, 1126-1135.

**Austin WR, Armijo AL, Campbell DO, Singh AS, Hsieh T, Nathanson D, Herschman HR, Phelps ME, Witte ON, Czermin J, Radu CG (2012).** Nucleoside salvage pathway kinases regulate hematopoiesis by linking nucleotide metabolism with replication stress. *J Exp Med* 209(12), 2215-2228.

**Ayad NG (2005).** CDKs give Cdc6 a license to drive into s phase. *Cell* 122, 825-827.

**Aye Y, Li M, Long MJ, Weiss RS (2015).** Ribonucleotide reductase and cancer: biological mechanisms and targeted therapies. *Oncogene* 34(16), 2011-2021.

**Ayuda-Durán P, Devesa F, Gomes F, Sequeira-Mendes J, Avila-Zarza C, Gómez M, Calzada A (2014).** The CDK regulators Cdh1 and Sic1 promote efficient usage of DNA replication origins to prevent chromosomal instability at a chromosome arm. *Nucleic Acids Res* 42(11), 7057-7068.

**Ballabeni A, Melixetian M, Zamponi R, Masiero L, Marinoni F, Helin K (2004).** Human geminin promotes pre-RC formation and DNA replication by stabilizing CDT1 in mitosis. *EMBO J* 23, 3122-3132.

**Ballabeni A, Zamponi R, Moore J, Helin K, Kirschner MW (2013).** Geminin deploys multiple mechanisms to regulate Cdt1 before cell division thus ensuring the proper execution of DNA replication. *Proc Natl Acad Sci USA* 110(30), E2848-2853.

**Barlow JH, Faryabi RB, Callén E, Wong N, Malhowski A, Chen HT, Gutierrez-Cruz G, Sun HW, McKinnon P, Wright G, Casellas R, Robbiani DF, Staudt L (2013).** Identification of early replicating fragile sites that contribute to genome stability. *Cell* 152(3), 620-632.

**Bashir T, Dorrello NV, Amador V, Guardavaccaro D, Pagano M (2004).** Control of the SCF(Skp2-Cks1) ubiquitin ligase by the APC/C(Cdh1) ubiquitin ligase. *Nature* 431, 190-193.

**Basserman F, Frescas D, Guardavaccaro D, Busino L, Peschiaroli A, Pagano M (2008).** The Cdc14B-Cdh1-Plk1 axis controls the G2 DNA damage response checkpoint. *Cell* 134(2), 256-267.

**Beck H, Nähse-Kumpf V, Larsen MS, O'Hanlon KA, Patzke S, Holmberg C, Mejlvang J, Groth A, Nielsen O, Syljuasen RG, Sorensen CS (2012).** Cyclin-dependent kinase suppression by WEE1 kinase protects the genome through control of replication initiation and nucleotide consumption. *Mol Cell Biol* 32(20), 4226-4236.

**Bell SP, Dutta A (2002).** DNA replication in eukaryotic cells. *Annu Rev Biochem* 71, 333-374.

**Ben-Yehoyada M, Gautier J, Dupré A (2007).** The DNA damage response during an unperturbed S-phase. *DNA Repair* 6(7), 914-922.

**Bermejo R, Capra T, Jossen R, Colosio A, Frattini C, Carotenuto W, Cocito A, Doksani Y, Klein H, Gómez-González B, Aguilera A, Katou Y, Shirahige K, Foiani M (2011).** The replication checkpoint protects fork stability by releasing transcribed genes from nuclear pores. *Cell* 146(2), 233-246.

**Bermejo R, Lai MS, Foiani M (2012).** Preventing replication stress to maintain genome stability: resolving conflicts between replication and transcription. *Mol Cell* 45(6), 710-718.

**Bernstein KA, Gangloff S, Rothstein R (2010).** The RecQ DNA helicases in DNA repair. *Annu Rev Genet* 44, 393-417.

**Besse A, Wu P, Bruni F, Donti T, Graham BH, Craigen WJ, McFarland R, Moretti P, Lalani S, Scott KL, Taylor RW, Bonnen PE (2015).** The GABA transaminase, ABAT, is essential for mitochondrial nucleoside metabolism. *Cell Metab* 21(3), 417-427.

**Besson A, Dowdy SF, Roberts JM (2008).** CDK inhibitors: cell cycle regulators and beyond. *Dev Cell* 14(2), 159-169.

**Bester AC, Roniger M, Oren YS, Im MM, Sarni D, Chaoat M, Bensimon A, Zamir G, Shewach DS, Kerem B (2011).** Nucleotide deficiency promotes genomic instability in early stages of cancer development. *Cell* 145(3), 435-446.

**Björklund S, Skog S, Tribukai B, Thelander L (1990).** S-phase-specific expression of mammalian ribonucleotide reductase R1 and R2 subunit mRNAs. *Biochemistry* 29(23), 5452-5458.

**Bochman ML, Paeschke K, Zakian VA (2012).** DNA secondary structures: stability and function of G-quadruplex structures. *Nat Rev Genet* 13(11), 770-780.

**Boos D, Sánchez-Pulido L, Rappas M, Pearl LH, Oliver AW, Ponting CP, Diffley JF (2011).** Regulation of DNA replication through Sld3-Dpb11 is conserved from yeast to humans. *Curr Biol* 21, 1152-1157.

**Brandeis M, Hunt T (1996).** The proteolysis of mitotic cyclins in mammalian cells persists from the end of mitosis until the onset of S phase. *EMBO J* 15, 5280-5289.

**Buckland RJ, Watt DL, Balasubramanyam C, Nilsson AK, Kunkel TA, Chabes A (2014).** Increased and imbalanced dNTP pools symmetrically promote both leading and lagging strand replication infidelity. *PLoS Genet* 10(12), e1004846.

**Burhans WC, Weinberger M (2007).** DNA replication stress, genome instability and aging. *Nucleic Acids Res* 35(22), 7545-7556.

**Burma S, Chen BP, Murphy M, Kurimasa A, Chen DJ (2001).** ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks. *J Biol Chem* 276(45), 42462-42467.

**Burrell RA, McClelland SE, Endesfelder D, Groth P, Weller MC, Shaikh N, Domingo E, Kanu N, Dewhurst SM, Gronroos E, Chew SK, Rowan AJ, Schenk A, Sheffer M, Howell M, Kschischo M, Behrens A, Helleday T, Bartek J, Tomlinson IP, Swanton C (2013).** Replication stress links structural and numerical cancer chromosomal instability. *Nature* 494(7438), 492-496.

**Cadorete JC, Meisch F, Hassan-Zadeh V, Luyten I, Guillet C, Duret L, Quesneville H, Prioleau MN (2008).** Genome-wide studies highlight indirect links between human replication origins and gene regulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 105(41), 15837-15842.

**Cardozo T, Pagano M (2004).** The SCF ubiquitin ligase: insights into a molecular machine. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5(9), 739-751.

**Carrano AC, Eytan E, Hershko A, Pagano M (1999).** SKP2 is required for ubiquitin-mediated degradation of the CDK inhibitor p27. *Nat Cell Biol* 1(4), 193-199.

**Castro A, Bernis C, Vigneron S, Labbé JC, Lorca T (2005).** The anaphase-promoting complex: a key factor in the regulation of cell cycle. *Oncogene* 24(3), 314-325.

**Chabes A, Thelander L (2000).** Controlled protein degradation regulates ribonucleotide reductase activity in proliferating mammalian cells during the normal cell cycle and in response to DNA damage and replication blocks. *J Biol Chem* 275(23), 17747-17753.

**Chabes AL, Björklund S, Thelander L (2004).** S phase-specific transcription of the mouse ribonucleotide reductase R2 gene requires both a proximal repressive E2F-binding site and an upstream promoter activating region. *J Biol Chem* 279(11), 10796-10807.

**Chabes AL, Pflieger CM, Kirschner MW, Thelander L (2003).** Mouse ribonucleotide reductase R2 protein: a new target for anaphase-promoting complex-Cdh1-mediated proteolysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 100(7), 3925-3929.



**Chabosseau P, Buhagiar-Labarchède G, Onclercq-Delic R, Lambert S, Debatisse M, Brison O, Amor-Guéret M (2011).** Pyrimidine pool imbalance induced by BLM helicase deficiency contributes to genetic instability in Bloom syndrome. *Nat Commun* 2, 368.

**Chang L, Zhang Z, Yang J, McLaughlin SH, Barford D (2015).** Atomic structure of the APC/C and its mechanism of protein ubiquitination. *Nature* 522(7557), 450-454.

**Chen YL, Eriksson S, Chang ZF (2010).** Regulation and functional contribution of thymidine kinase 1 in repair of DNA damage. *Cell Biol* 285,27327-27335.

**Clemente-Ruiz M, Prado F (2009).** Chromatin assembly controls replication fork stability. *EMBO Rep* 10(7), 790-796.

**Clijsters L, Ogink J, Wolthuis R (2013).** The spindle checkpoint, APC/CCdc20, and APC/CCdh1 play distinct roles in connecting mitosis to S phase. *J Cell Biol* 201(7), 1013-1026.

**Collins AR (2004).** The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol Biotechnol* 26(3), 249-261.

**Colombo SL, Palacios-Callender M, Frakich N, De Leon J, Schmitt CA, Boorn L, Davis N, Moncada S (2010).** Anaphase-promoting complex/cyclosome-Cdh1 coordinates glycolysis and glutaminolysis with transition to S phase in human T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 107(44), 18868-18873.

**Conti C, Leo E, Eichler GS, Sordet O, Martin MM, Fan A, Aladjem MI (2010).** Inhibition of histone deacetylase in cancer cells slows down replication forks, activates dormant origins and induces DNA damage. *Cancer Res* 70(11), 4470-4480.

**Cortez D, Guntuku J, Qin SJ, Elledge (2001).** ATR and ATRIP: partners in checkpoint signaling. *Science* 294, 1713-1716.

**Costanzo V, Robertson K, Bibikova M, Kim E, Grieco D, Gottesman M, Carroll D, Gautier J (2001).** Mre11 protein complex prevents double-strand break accumulation during chromosomal DNA replication. *Mol Cell* 8, 137-147.

**Costanzo V, Shechter D, Lupardus PJ, Cimprich KA, Gottesman M, Gautier J (2003).** An ATR-and Cdc7 -dependent DNA damage checkpoint that inhibits initiation of DNA replication. *Mol Cell* 11(1), 203-213.

**Couch FB, Bansbach CE, Driscoll R, Luzwick JW, Glick GG, Bétous R, Carroll CM, Jung SY, Qin J, Cimprich KA, Cortez D (2013).** ATR phosphorylates SMARCA1 to prevent replication fork collapse. *Genes Dev* 27(14), 1610-1623.

**Cuvier O, Stanojic S, Lemaitre JM, Méchali M (2008).** A topoisomerase II-dependent mechanism for resetting replicons at the S-M-phase transition. *Genes Dev* 22(7), 860-865.

**D'Angiolella V, Donato V, Forrester FM, Jeong YT, Pellacani C, Kudo Y, Saraf A, Florens L, Washburn MP, Pagano M (2012).** Cyclin F-mediated degradation of ribonucleotide reductase M2 controls genome integrity and DNA repair. *Cell* 149(5), 1023-1034.

**Da Fonseca PC, Kong EH, Zhang Z, Schreiber A, Williams MA, Morris EP, Barford D (2011).** Structures of APC/C(Cdh1) with substrates identify Cdh1 and Apc10 as the D-box co-receptor. *Nature* 470, 274-278.

**Dahmann C, Diffley JFX, Nasmyth KA (1995).** S-phase-promoting cyclin-dependent kinases prevent re-replication by inhibiting the transition of replication origins to a pre-replicative state. *Curr Biol* 5(11), 1257-1269.

**Davidson MB, Katou Y, Keszthelyi A, Sing TL, Xia T, Ou J, Vaisica JA, Thevakumaran N, Marjavaara L, Myers CL, Chabes A, Shirahige K, Brown GW (2012).** Endogenous DNA replication stress results in expansion of dNTP pools and a mutator phenotype. *EMBO J* 31(4), 895-907.

**De Antoni A, Pearson CG, Cimini D, Canman JC, Sala V, Nezi L, Mapelli M, Sironi L, Faretta M, Salmon ED, Musacchio A (2005).** The Mad1/Mad2 complex as a template for Mad2 activation in the spindle assembly checkpoint. *Curr Biol* 15(3), 214-225.

**Debatisse M, Le Tallec B, Letessier A, Dutrillaux B, Brison O (2012).** Common fragile sites: mechanisms of instability revisited. *Trends Genet* 28(1), 22-32.

**Delgado-Esteban M, García-Higuera I, Maestre C, Moreno S, Almeida A (2013).** APC/C-Cdh1 coordinates neurogenesis and cortical size during development. *Nat Commun* 4, 2879.

**Detweiler CS, Li JJ (1998).** Ectopic induction of Clb2 in early G1 phase is sufficient to block prereplicative complex formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA* 95(5), 2384-2389.

**Di Fiore B, Pines J (2010).** How cyclin A destruction escapes the spindle assembly checkpoint. *J*

*Cell Biol* 190,501-509.

**Diffley JFX (2004).** Regulation of early events in chromosome replication. *Curr Biol* 14, 778-786.

**Diffley JFX (2011).** The many faces of redundancy in DNA replication control. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 75, 135-142.

**Donzelli M, Squatrito M, Ganoth Dvora, Hershko A, Pagano M, Draetta GF (2002).** Dual mode of degradation of Cdc25A phosphatase. *EMBO J* 21(18), 4875-4884.

**Duan S, Pagano M (2011).** Linking metabolism and cell cycle progression via the APC/C<sup>Cdh1</sup> and SCF<sup>βTrCP</sup> ubiquitin ligases. *Proc Natl Acad Sci USA* 108(52), 20857-20858.

**Eguren M, Manchado E, Malumbres M (2011).** Non-mitotic functions of the Anaphase-Promoting Complex. *Semin Cell Dev Biol* 22(6), 572-578.

**Eguren M, Porlan E, Manchado E, García-Higuera I, Cañamero M, Fariñas I, Malumbres M (2013).** The APC/C cofactor Cdh1 prevents replicative stress and p53-dependent cell death in neural progenitors. *Nat Commun* 4, 2880.

**Ekholm-Reed S, Méndez J, Tedesco D, Zetterberg A, Stillman B, Reed SI (2004).** Deregulation of cyclin E in human cells interferes with prereplication complex assembly. *J Cell Biol* 165(6), 789-800.

**Engelbert D, Schnerch D, Baumgarten A, Wäsch R (2008).** The ubiquitin ligase APC<sup>Cdh1</sup> is required to maintain genome integrity in primary human cells. *Oncogene* 27,907-917.

**Fachinetti D, Bermejo R, Cocito A, Minardi S, Katou Y, Kanoh Y, Shirahige K, Azvolinsky A, Zakian VA, Foiani M (2010).** Replication termination at eukaryotic chromosomes is mediated by Top2 and occurs at genomic loci containing pausing elements. *Mol Cell* 39(4), 595-605.

**Fenech M, Kirsch-Volders M, Natarajan AT, Surralles J, Croft JW, Parry J, Norppa H, Eastmond DA, Tucker JD, Thomas P (2011).** Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. *Mutagenesis* 26(1), 125-132.

**Flach J, Bakker ST, Mohrin M, Conroy PC, Pietras EM, Reynaud D, Alvarez S, Diolaiti ME, Ugarte F, Forsberg EC, Le Beau MM, Stohr BA, Méndez J, Morrison CG, Passegué E (2014).** Replication stress is a potent driver of functional decline in ageing haematopoietic stem cells. *Nature* 512

**Floyd S, Pines J, Lindon C (2008).** APC/C Cdh1 targets aurora kinase to control reorganization of the mitotic spindle at anaphase. *Curr Biol* 18(21), 1649-1658.

**Franzolin E, Pontarin G, Rampazzo C, Miazzi C, Ferraro P, Palumbo E, Reichard P, Bianchi V (2013).** The deoxynucleotide triphosphohydrolase SAMHD1 is a major regulator of DNA precursor pools in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 110(35),14272-14277.

**Frye JJ, Brown NG, Petzold G, Watson ER, Grace CR, Nourse A, Jarvis MA, Kriwacki RW, Peters JM, Stark H, Schulman BA (2013).** Electron microscopy structure of human APC/C(CDH1)-EMI1 reveals multimodal mechanism of E3 ligase. *Nat Struct Mol Biol* 20(7), 827-835.

**Fu AK, Hung KW, Fu WY, Shen C, Chen Y, Xia J, Lai KO, Ip NY (2011).** APC(Cdh1) mediates EphA4-dependent downregulation of AMPA receptors in homeostatic plasticity. *Nat Neurosci*. 14(2), 181-190.

**Fujita T, Liu W, Doihara H, Date H, Wan Y (2008).** Dissection of the APC<sup>Cdh1</sup>-Skp2 cascade in breast cancer. *Clin Cancer Res*. 14(7), 1966-1975.

**Fujita T, Liu W, Doihara H, Wan Y (2008).** Regulation of Skp2-p27 axis by the Cdh1/anaphase-promoting complex pathway in colorectal tumorigenesis. *Am J Pathol* 173(1), 217-228.

**Fukushima H, Ogura K, Wan L, Lu Y, Li V, Gao D, Liu P, Lau AW, Wu T, Kirschner MW, Inuzuka H, Wei W (2013).** SCF-mediated Cdh1 degradation defines a negative feedback system that coordinates cell-cycle progression. *Cell Rep* 4(4), 803-816.

**Gaglio D, Soldati C, Vanoni M, Alberghina L, Chiaradonna F (2009).** Glutamine deprivation induces abortive S-phase rescued by deoxyribonucleotides in *K-Ras* transformed fibroblasts. *PLoS One* 4(3), e4715.

**Gambus A, Jones RC, Sanchez-Diaz A, Kanemaki M, van Deursen F, Edmondson RD, Labib K (2006).** GINS maintains association of Cdc45 with MCM in replisome progression complexes at eukaryotic DNA replication forks. *Nat Cell Biol* 8(4), 358-366.

**García-Higuera I, Manchado E, Dubus P, Cañamero M, Méndez J, Moreno S, Malumbres M (2008).** Genomic stability and tumour suppression by the APC/C cofactor Cdh1. *Nat Cell Biol* 10(7), 802-811.

**Ge XQ, Jackson DA, Blow JJ (2007).** Dormant origins licensed by excess Mcm2-7 are required for human cells to survive replicative stress. *Genes Dev* 21(24), 3331-3341.

**Gelot C, Magdalou I, Lopez BS (2015).** Replication stress in mammalian cells and its consequences for mitosis. *Genes* 6(2), 267-298.

**Geng Y, Yu Q, Sicinska E, Das M, Schneider JE, Bhattacharya S, Rideout WM, Bronson RT, Gardner H, Sicinski P (2003).** Cyclin E ablation in the mouse. *Cell* 114(4), 431-443.

**Gieffers A, Peters BH, Kramer ER, Dotti CG, Peters JM (1999).** Expression of the CDH1-associated form of the anaphase-promoting complex in postmitotic neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 96(20), 11317-11322.

**Grosskortenhaus R, Sprenger F (2002).** Rca1 inhibits APC-Cdh1<sup>Fzr</sup> and is required to prevent cyclin degradation in G2. *Dev Cell* 2, 29-40.

**Gstaiger M, Jordan R, Lim M, Catzavelos C, Mestan J, Slingerland J, Krek W (2001).** Skp2 is oncogenic and overexpressed in human cancers. *PNAS* 98(9), 5043-5048.

**Guarino E, Salguero I, Kearsley SE (2014).** Cellular regulation of ribonucleotide reductase in eukaryotes. *Semin Cell Dev Biol* 30, 97-103.

**Guillou E, Ibarra A, Coulon V, Casado-Vela J, Rico D, Casal I, Schwob E, Losada A, Méndez J (2010).** Cohesin organizes chromatin loops at DNA replication factories. *Genes Dev* 24(24), 2812-2822.

**Guo C, Kumagai A, Schlacher K, Shevchenko A, Shevchenko A, Dunphy WG (2015).** Interaction of Chk1 with Treslin negatively regulates the initiation of chromosomal DNA replication. *Mol Cell* 57(3), 492-505.

**Hagting A, Den Elzen N, Vodermaier HC, Waizenegger IC, Peters JM, Pines J (2002).** Human securin proteolysis is controlled by the spindle checkpoint and reveals when the APC/C switches from activation by Cdc20 to Cdh1. *J Cell Biol* 157(7), 1125-1137.

**Hakansson P, Hofer A, Thelander L (2006).** Regulation of mammalian ribonucleotide reduction and dNTP pools after DNA damage and in resting cells. *J Biol Chem* 281(12), 7834-7841.

**Harbour JW, Dean DC (2000).** The Rb/E2F pathway: expanding roles and emerging paradigms. *Genes Dev* 14(19), 2393-2409.

**Hayes MJ, Kimata Y, Wattam SL, Lindon C, Mao G, Yamano H, Fry AM (2006).** Early mitotic degradation of Nek2A depends on Cdc20-independent interaction with the APC/C. *Nat Cell Biol*

8(6), 607-614.

**Hellmuth S, Pöhlmann C, Brown A, Böttger F, Sprinzl M, Stemmann O (2015).** Positive and negative regulation of vertebrate separase by Cdk1-cyclin B1 may explain why securin is dispensable. *J Biol Chem* 290(12), 8002-8010.

**Herrero-Méndez A, Almeida A, Fernández E, Maestre C, Moncada S, Bolaños JP (2009).** The bioenergetic and antioxidant status of neurons is controlled by continuous degradation of a key glycolytic enzyme by APC/C-Cdh1. *Nat Cell Biol* 11(6), 747-752.

**Herrick J, Sclavi B (2007).** Ribonucleotide reductase and the regulation of DNA replication: an old story and an ancient heritage. *Mol Microbiol* 63(1), 22-34.

**Hills SA, Diffley JF (2014).** DNA replication and oncogene-induced replicative stress. *Curr Biol* 24(10), 435-444.

**Hofer A, Crona M, Logan DT, Sjöberg BM (2012).** DNA building blocks: keeping control of manufacture. *Critic Rev Biochem Mol Biol* 47(1), 50-63.

**Holt JE, Lane SIR, Jennings P, García-Higuera I, Moreno S, Jones KT (2012).** APC<sup>FZR1</sup> prevents nondisjunction in mouse oocytes by controlling meiotic spindle assembly timing. *Mol Biol Cell* 23(20), 3970-3981.

**Holt JE, Pye V, Boon E, Stewart JL, García-Higuera I, Moreno S, Rodríguez R, Jones KT, McLaughlin EA (2014).** The APC/C activator FZR1 is essential for meiotic prophase I in mice. *Development* 141(6), 1354-1365.

**Holt JE, Tran SM, Stewart JL, Minahan K, García-Higuera I, Moreno S, Jones KT (2011).** The APC/C activator FZR1 coordinates the timing of meiotic resumption during prophase I arrest in mammalian oocytes. *Development* 138(5), 905-913.

**Homer H (2013).** The APC/C in female mammalian meiosis I. *Reproduction* 146(2), 61-71.

**Hossain M, Stillman B (2012).** Meier-Gorlin syndrome mutations disrupt an Orc1 CDK inhibitory domain and cause centrosome reduplication. *Genes Dev* 26, 1797-1810.

**Hsu JY, Reimann JD, Sørensen CS, Lukas J, Jackson PK (2002).** E2F-dependent accumulation of hEmi1 regulates S phase entry by inhibiting APC(Cdh1). *Nat Cell Biol* 4(5), 358-366.

**Ibarra A, Schwob E, Méndez J (2008).** Excess MCM proteins protect human cells from replicative stress by licensing backup origins of replication. *Proc Natl Acad Sci USA* 105(26), 8956-8961.

**Ichijima Y, Yoshioka K, Yoshioka Y, Shinohe K, Fujimori H, Unno J, Takagi M, Goto H, Inagaki M, Mizutani S, Teraoka H (2010).** DNA lesions induced by replication stress trigger mitotic aberration and tetraploidy development. *PLoS One* 5(1), e8821.

**Ilves I, Petojevic T, Pesavento JJ, Botchan MR (2010).** Activation of the MCM2-7 helicase by association with Cdc45 and GINS proteins. *Mol Cell* 37(2), 247-258.

**Jackson DA, Pombo A (1998).** Replicon clusters are stable units of chromosome structure: evidence that nuclear organization contributes to the efficient activation and propagation of S phase in human cells. *J Cell Biol* 140(6), 1285-1295.

**Jin J, Shirogane T, Xu L, Nalepa G, Qin J, Elledge SJ, Harper JW (2003).** SCFbeta-TRCP links Chk1 signaling to degradation of the Cdc25A protein phosphatase. *Genes Dev* 17, 3062-3074.

**Jones RJ, Baladandayuthapani V, Neelapu S, Fayad LE, Romaguera JE, Wang M, Sharma R, Yang D, Orlowski RZ (2011).** HDM-2 inhibition suppresses expression of ribonucleotide reductase subunit, and synergistically enhances gemcitabine-induced cytotoxicity in mantle cell lymphoma. *Blood* 118(15), 4140-4149.

**Jones RM, Mortusewicz O, Afzal I, Lorvellec M, García P, Helleday T, Petermann E (2013).** Increased replication initiation and conflicts with transcription underlie Cyclin E-induced replication stress. *Oncogene* 32(32), 3744-3753.

**Jones RM, Petermann E (2012).** Replication fork dynamics and the DNA damage response. *Biochem* 443(1), 13-26.

**Katsuno Y, Suzuki A, Sugimura K, Okumura K, Zineldeen DH, Shimada M, Niida H, Mizuno T, Hanaoka F, Nakanishi M (2009).** Cyclin A-Cdk1 regulates the origin firing program in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 106(9), 3184-3189.

**Ke PY, Chang ZF (2004).** Mitotic degradation of human thymidine kinase 1 is dependent on the anaphase-promoting complex/cyclosome-CDH1-mediated pathway. *Mol Cell Biol* 24(2), 514-526.



**Ke PY, Kuo YY, Hu CM, Chang ZF (2005).** Control of dTTP pool size by anaphase promoting complex/cyclosome is essential for the maintenance of genetic stability. *Genes Dev* 19, 1920-1933.

**Kossatz U, Dietrich N, Zender L, Buer J, Manns MP, Malek NP (2004).** Skp2-dependent degradation of p27Kip1 is essential for cell cycle progression. *Genes Dev* 18(21), 2602-2607.

**Kotani S, Tugendreich S, Fujii M, Jorgensen PM, Watanabe N, Hoog C, Hieter P, Todokoro K (1998).** PKA and MPF-activated polo-like kinase regulate anaphase-promoting complex activity and mitosis progression. *Mol Cell* 1(3), 371-380.

**Krasinska L, Besnard E, Cot E, Dohet C, Méchali M, Lemaitre JM, Fisher D (2008).** Cdk1 and Cdk2 activity levels determine the efficiency of replication origin firing in *Xenopus*. *EMBO J* 27(5), 758-769.

**Kulukian A, Han JS, Cleveland DW (2009).** Unattached kinetochores catalyze production of an anaphase inhibitor that requires a Mad2 template to prime Cdc20 for BubR1 binding. *Dev Cell* 16(1), 105-117.

**Kumagai A, Shevchenko A, Shevchenko A, Dunphy WG (2011).** Direct regulation of Treslin by cyclin-dependent kinase is essential for the onset of DNA replication. *J Cell Biol* 193(6), 995-1007.

**Lafranchi L, de Boer HR, de Vries EG, Ong SE, Sartori AA, van Vugt MA (2014).** APC/C (Cdh1) controls CtIP stability during the cell cycle and in response to DNA damage. *EMBO J* 33(23), 2860-2879.

**Lambert S, Carr AM (2013).** Impediments to replication fork movement: stabilisation, reactivation and genome stability. *Chromosome* 122, 33-45.

**Lasorella A, Stegmüller J, Guardavaccaro D, Liu G, Carro MS, Rothschild G, de la Torre-Ubieta L, Pagano M, Bonni A, Iavarone A (2006).** Degradation of Id2 by the anaphase-promoting complex couples cell cycle exit and axonal growth. *Nature* 442, 471-474.

**Lazzaro F, Novarina D, Amara F, Watt DL, Stone JE, Costanzo V, Burgers PM, Kunkel TA, Plevani P, Muzi-Falconi M (2012).** RNase H and postreplication repair protect cells from ribonucleotides incorporated in DNA. *Mol Cell* 45(1), 99-110.

**Lecona E, Fernández-Capetillo O (2014).** Replication stress and cancer: it takes two to tango.



*Exp Cell Res* 329(1), 26-34.

**Lee HO, Davidson JM, Duronio RJ (2009).** Endoreplication: polyploidy with purpose. *Genes Dev* 23, 2461-2477.

**Lee J, Kumagai A, Dunphy WG (2007).** The Rad9-Hus1-Rad1 checkpoint clamp regulates interaction of TopBP1 with ATR. *J Biol Chem* 282, 28036-28044.

**Lee KY, Bang SW, Yoon SW, Lee SH, Yoon JB, Hwang DS (2012).** Phosphorylation of ORC2 protein dissociates origin recognition complex from chromatin and replication origins. *J Biol Chem* 287(15), 11891-11898.

**Lehman NL, Tibshirani R, Hsu JY, Natkunam Y, Harris BT, West RB, Masek MA, Montgomery K, van de Rijn M, Jackson PK (2007).** Oncogenic regulators and substrates of the anaphase promoting complex/cyclosome are frequently overexpressed in malignant tumors. *Am J Pathol* 170(5), 1793-1805.

**Lehman NL, Verschuren EW, Hsu JY, Cherry AM, Jackson PK (2006).** Overexpression of the anaphase promoting complex/cyclosome inhibitor Emi1 leads to tetraploidy and genomic instability of p53-deficient cells. *Cell Cycle* 5(14), 1569-1573.

**Li M, Shin YH, Hou L, Huang X, Wei Z, Klann E, Zhang P (2008).** The adaptor protein of the anaphase promoting complex Cdh1 is essential in maintaining replicative lifespan and in learning and memory. *Nat Cell Biol* 10(9), 1083-1089.

**Li M, Zhang P (2009).** The function of APC/C<sup>Cdh1</sup> in cell cycle and beyond. *Cell Division* 4, 2.

**Li W, Wu G, Wan Y (2007).** The dual effects of Cdh1/APC in myogenesis. *FASEB J* 21(13), 3606-3617.

**Listovsky T, Oren YS, Yudkovsky Y, Mahbubani HM, Weiss AM, Lebediker M, Brandeis M (2004).** Mammalian Cdh1/Fzr mediates its own degradation. *EMBO J* 23(7), 1619-1626.

**Listovsky T, Sale JE (2013).** Sequestration of CDH1 by MAD2L2 prevents premature APC/C activation prior to anaphase onset. *J Cell Biol* 203(1), 87-100.

**Liu Q, Guntuku S, Cui XS, Matsuoka S, Cortez D, Tamai K, Luo G, Carattini-Rivera S, DeMayo F, Bradley A, Donehower LA, Elledge SJ (2000).** Chk1 is an essential kinase that is regulated by Atr and required for the G(2)/M DNA damage checkpoint. *Genes Dev* 14, 1448-1459.

**Liu X, Zhang H, Lai L, Wang X, Loera S, Xue L, He H, Zhang K, Hu S, Huang Y, Nelson RA, Zhou B, Zhou L, Chu P, Zhang S, Zheng S, Yen Y (2013).** Ribonucleotide reductase small subunit M2 serves as a prognostic biomarker and predicts poor survival of colorectal cancers. *Clin Sci* 124(9), 567-578.

**Lomonosov M, Anand S, Sangrithi M, Davies R, Venkitaraman AR (2003).** Stabilization of stalled DNA replication forks by the BRCA2 breast cancer susceptibility protein. *Genes Dev* 17, 3017-3022.

**López-Contreras AJ, Fernandez-Capetillo O (2010).** The ATR barrier to replication-born DNA damage. *DNA Repair* 9, 1249-1255.

**López-Contreras AJ, Specks J, Barlow JH, Ambrogio C, Desler C, Vikingsson S, Rodrigo-Perez S, Green H, Rasmussen LJ, Murga M, Nussenzweig A, Fernandez-Capetillo O (2015).** Increased *Rrm2* gene dosage reduces fragile site breakage and prolongs survival of ATR mutant mice. *Genes Dev* 29(7), 690-695.

**Lukas C, Savic V, Bekker-Jensen S, Doil C, Neumann B, Pedersen RS, Grofte M, Chan KL, Hickson ID, Bartek J, Lukas J (2011).** 53BP1 nuclear bodies form around DNA lesions generated by mitotic transmission of chromosomes under replication stress. *Nat Cell Biol* 13(3), 243-253.

**Lukas C, Sorensen CS, Kramer E, Santoni-Rugiu E, Lindeneg C, Peters JM, Bartek J, Lukas J (1999).** Accumulation of cyclin B1 requires E2F and cyclin-A-dependent rearrangement of the anaphase-promoting complex. *Nature* 401, 815-818.

**Luo RX, Postigo AA, Dean DC (1998).** Rb interacts with histone deacetylase to repress transcription. *Cell* 92(4), 463-473.

**Ma XJ, Salunga R, Tuggle JT, Gaudet J, Enright E, McQuary P, Payette T, Pistone M, Stecker K, Zhang BM, Zhou YX, Varnholt H, Smith B, Gadd M, Chatfield E, Kessler J, Baer TM, Erlander MG, Sgroi DC (2003).** Gene expression profiles of human breast cancer progression. *Proc Natl Acad Sci USA* 100(10), 5974-5979.

**Macheret M, Halazonetis TD (2015).** DNA replication stress as a hallmark of cancer. *Annu Rev Pathol* 10, 425-428.

**Machida YJ, Dutta A (2007).** The APC/C inhibitor, Emi1, is essential for prevention of rereplication. *Genes Dev* 21, 184-194.

**Magdalou I, Lopez BS, Pasero P, Lambert SA (2014).** The causes of replication stress and their consequences on genome stability and cell fate. *Semin Cell Dev Biol* 30, 154-164.

**Mailand N, Diffley JF (2005).** CDKs promote DNA replication origin licensing in human cells by protecting Cdc6 from APC/C-dependent proteolysis. *Cell* 122(6), 915-926.

**Malumbres M, Barbacid M (2005).** Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends Biochem Sci* 30(11), 630-641.

**Malumbres M, Barbacid M (2009).** Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nat Rev Cancer* 9(3), 153-166.

**Manchado E, Eguren M, Malumbres M (2010).** The anaphase-promoting complex/cyclosome (APC/C): cell-cycle-dependent and -independent functions. *Biochem Soc Trans* 38(Pt 1), 65-71.

**Mannava S, Moparthy KC, Wheeler LJ, Leonova KI, Wawrzyniak JA, Bianchi-Smiraglia A, Berman AE, Flanagan S, Shewach DS, Zeitouni NC, Gudkov AV, Mathews CK, Nikiforov MA (2012).** Ribonucleotide reductase and thymidylate synthase or exogenous deoxyribonucleosides reduce DNA damage and senescence caused by C-MYC depletion. *Aging* 4(12), 917-922.

**Manning AL, Yazinski SA, Nicolay B, Bryll A, Zou L, Dyson NJ (2014).** Suppression of genome instability in pRB-deficient cells by enhancement of chromosome cohesion. *Mol Cell* 53(6), 993-1004.

**Martínez JS, Jeong DE, Choi E, Billings BM, Hall MC (2006).** Acm1 is a negative regulator of the CDH1-dependent anaphase-promoting complex/cyclosome in budding yeast. *Mol Cell Biol* 26, 9162-9176.

**Masai H, Matsumoto S, You Z, Yoshizawa-Sugata N, Oda M (2010).** Eukaryotic chromosome DNA replication: where, when, and how? *Annu Rev Biochem* 79, 89-130.

**Mathews CK (2006).** DNA precursor metabolism and genomic stability. *FASEB J* 20(9), 1300-1314.

**Maya-Mendoza A, Petermann E, Gillespie DA, Caldecott KW, Jackson DA (2007).** Chk1 regulates the density of active replication origins during the vertebrate S phase. *EMBO J* 26(11), 2719-2731.

**Mazouzi A, Velimezi G, Loizou JI (2014).** DNA replication stress: causes, resolution and disease. *Exp Cell Res* 329(1), 85-93.

**McGarry TJ, Kirschner MW (1998).** Geminin, an inhibitor of DNA replication, is degraded during mitosis. *Cell* 93(6), 1043-1053.

**McMurray CT (2010).** Mechanisms of trinucleotide repeat instability during human development. *Nat Rev Genet* 11(11), 786-799.

**Méchalí M (2010).** Eukaryotic DNA replication origins: many choices for appropriate answers. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11(10), 728-738.

**Mejlvang J, Feng Y, Alabert C, Neelsen KJ, Jasencakova Z, Zhao X, Lees M, Sandelin A, Pasero P, Lopes M, Groth A (2014).** New histone supply regulates replication fork speed and PCNA unloading. *J Cell Biol* 204(1), 29-43.

**Méndez J, Stillman B (2000).** Chromatin association of human origin recognition complex, cdc6, and minichromosome maintenance proteins during the cell cycle: assembly of prereplication complexes in late mitosis. *Mol Cell Biol* 20(22), 8602-812.

**Meraldi P, Honda R, Nigg EA (2002).** Aurora-A overexpression reveals tetraploidization as a major route to centrosome amplification in p53<sup>-/-</sup> cells. *EMBO J* 21(4), 483-492.

**Miller JJ, Summers MK, Hansen DV, Nachury MV, Lehman NL, Loktev A, Jackson PV (2006).** Emi1 stably binds and inhibits the anaphase-promoting complex/cyclosome as a pseudosubstrate inhibitor. *Genes Dev* 20(17), 2410-2420.

**Mocciaro A, Rape M (2012).** Emerging regulatory mechanisms in ubiquitin-dependent cell cycle control. *J Cell Sci* 125(Pt 2), 255-263.

**Morikawa T, Maeda D, Kume H, Homma Y, Fukayama M (2010).** Ribonucleotide reductase M2 subunit is a novel diagnostic marker and a potential therapeutic target in bladder. *Histopathology* 57(6), 885-892.

**Murga M, Bunting S, Montaña MF, Soria R, Mulero F, Cañamero M, Lee Y, McKinnon PJ, Nussenzweig A, Fernandez-Capetillo O (2009).** A mouse model of the ATR-Seckel Syndrome reveals that replicative stress during embryogenesis limits mammalian lifespan. *Nat Genet* 41(8), 891-898.

**Murr R, Loizou JI, Yang YG, Cuenin C, Li H, Wang ZQ, Herceg Z (2006).** Histone acetylation by Trapp-Tip60 modulates loading of repair proteins and repair of DNA double-strand breaks. *Nat Cell Biol* 8(1), 91-99.

**Nakayama K, Nagahama H, Minamishima YA, Matsumoto M, Nakamichi I, Kitagawa K, Shirane M, Tsunematsu R, Tsukiyama T, Ishida N, Kitagawa M, Nakayama K, Hatakeyama S (2000).** Targeted disruption of Skp2 results in accumulation of cyclin E and p27<sup>Kip1</sup>, polyploidy and centrosome overduplication. *EMBO J* 19(9), 2069-2081.

**Nakayama KI, Nakayama K (2006).** Ubiquitin ligases: cell-cycle control and cancer. *Nat Rev Cancer* 6(5), 369-381.

**Nasmyth K (1993).** Control of the yeast cell cycle by the Cdc28 protein kinase. *Curr Opin Cell Biol* 5(2), 166-179.

**Niida H, Shimada M, Murakami H, Nakanishi M (2010).** Mechanisms of dNTP supply that play an essential role in maintaining genome integrity in eukaryotic cells. *Cancer Sci* 101(12), 2505-2509.

**Olive PL, Banáth JP (2006).** The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. *Nat Protoc* 1, 23-29.

**Palzkill TG, Newlon CS (1988).** A yeast replication origin consists of multiple copies of a small conserved sequence. *Cell* 53(5), 441-450.

**Panier S, Boulton SJ (2014).** Double-strand break repair: 53BP1 comes into focus. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15(1), 7-18.

**Perry JA, Kornbluth S (2007).** Cdc25 and Wee1: analogous opposites? *Cell Division* 4, 2-12.

**Petermann E, Maya-Mendoza A, Zachos G, Gillespie DA, Jackson DA, Caldecott KW (2006).** Chk1 requirement for high global rates of replication fork progression during normal vertebrate S phase. *Mol Cell Biol* 26(8), 3319-3326.

**Petermann E, Woodcock M, Helleday T (2010).** Chk1 promotes replication fork progression by controlling replication initiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 107(37), 16090-16095.

**Peters JM (2006).** The anaphase promoting complex/cyclosome: a machine designed to destroy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7(9), 644-656.

**Petersen BO, Lukas J, Sorensen CS, Bartek J, Helin K (1999).** Phosphorylation of mammalian CDC6 by cyclin A/CDK2 regulates its subcellular localization. *EMBO J* 18(2), 396-410.

**Petersen BO, Wagener C, Marinoni F, Kramer ER, Melixetian M, Lazzerini Denchi E, Gieffers C, Matteucci C, Peters JM, Helin K (2000).** Cell cycle- and cell growth-regulated proteolysis of mammalian CDC6 is dependent on APC-CDH1. *Genes Dev* 14(18), 2330-2343.

**Pfleger CM, Kirschner MW (2000).** The KEN box: an APC recognition signal distinct from the D box targeted by Cdh1. *Genes Dev* 14(6), 655-665.

**Pick JE, Malumbres M, Klann E (2012).** The E3 ligase APC/C-Cdh1 is required for associative fear memory and long-term potentiation in the amygdala of adult mice. *Learn Mem* 20(1), 11-20.

**Pick JE, Wang L, Mayfield JE, Klann E (2013).** Neuronal expression of the ubiquitin E3 ligase APC/C-Cdh1 during development is required for long-term potentiation, behavioral flexibility, and extinction. *Neurobiol Learn Mem* 100, 25-31.

**Pines J (2011).** Cubism and the cell cycle: the many faces of the APC/C. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12(7), 427-438.

**Pizzi S, Sertic S, Orcesi S, Cereda C, Bianchi M, Jackson AP, Lazzaro F, Plevani P, Muzi-Falconi M (2015).** Reduction of hRNase H2 activity in Aicardi-Goutières syndrome cells leads to replication stress and genome instability. *Hum Mol Genet* 24(3), 649-658.

**Podhorecka M, Skladanowski A, Bozko P (2010).** H2AX phosphorylation: its role in DNA damage response and cancer therapy. *J Nucleic Acids* 2010, 920161.

**Poli J, Tsaponina O, Crabbé L, Keszthelyi A, Pantesco V, Chabes A, Lengronne A, Pasero P (2012).** dNTP pools determine fork progression and origin usage under replication stress. *EMBO J* 31(4), 883-894.

**Pontarin G, Ferraro P, Bee L, Reichard P, Bianchi V (2012).** Mammalian ribonucleotide reductase subunit p53R2 is required for mitochondrial DNA replication and DNA repair in quiescent cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 109(33), 13302-13307.

**Primorac I, Musacchio A (2013).** Panta rhei: the APC/C at steady state. *J Cell Biol* 201(2), 177-189.

**Ramer MD, Suman ES, Richter H, Stanger K, Spranger M, Bieberstein N, Duncker BP (2013).**

Dbf4 and Cdc7 proteins promote DNA replication through interactions with distinct Mcm2-7 protein subunits. *J Biol Chem* 288(21), 14926-14935.

**Rampakakis E, Di Paola D, Zannis-Hadjopoulos M (2008).** Ku is involved in cell growth, DNA replication and G1-S transition. *J Cell Sci* 121, 590-600.

**Rape M, Kirschner M (2004).** Autonomous regulation of the anaphase-promoting complex couples mitosis to S-phase entry. *Nature* 432, 588-595.

**Reijns MA, Rabe B, Rigby RE, Mill P, Astell KR, Lettice LA, Boyle S, Leitch A, Keighren M, Kilanowski F, Devenney PS, Sexton D, Grimes G, Holt IJ, Hill RE, Taylor MS, Lawson KA, Dorin JR, Jackson AP (2012).** Enzymatic removal of ribonucleotides from DNA is essential for mammalian genome integrity and development. *Cell* 149(5), 1008-1022.

**Reis A, Chang HY, Levasseur M, Jones KT (2006).** APCCdh1 activity in mouse oocytes prevents entry into the first meiotic division. *Nature Cell Biol* 8, 539-540.

**Rhind N, Gilbert DM (2013).** DNA replication timing. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5(8), a010132.

**Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS, Bonner WM (1998).** DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem* 273(10), 5858-5868.

**Ross KE, Cohen-Fix (2003).** The role of Cdh1p in maintaining genomic stability in budding yeast. *Genetics* 165(2), 489-503.

**Ruzankina Y, Asare A, Brown EJ (2008).** Replicative stress, stem cells and aging. *Ageing Dev* 129(7-8), 460-466.

**Ruzankina Y, Pinzon-Guzman C, Asare A, Ong T, Pontano L, Cotsarelis G, Zediak VP, Velez M, Bhandoola A, Brown EJ (2007).** Deletion of the developmentally essential gene ATR in adult mice leads to age-related phenotypes and stem cell loss. *Cell Stem Cell* 1(1), 113-126.

**Saha T, Ghosh S, Vassilev A, DePamphilis ML (2006).** Ubiquitylation, phosphorylation and Orc2 modulate the subcellular location of Orc1 and prevent it from inducing apoptosis. *J Cell Sci* 119(Pt 7), 1371-1382.

**Sanada T, Yokoi S, Arai S, Yasui K, Imoto I, Inazawa J (2004).** Skp2 overexpression is a p27Kip1-independent predictor of poor prognosis in patients with biliary tract cancers. *Cancer Sci*



95(12), 969-976.

**Santamaría D, Barrière C, Cerqueira A, Hunt S, Tardy C, Newton K, Cáceres JF, Dubus P, Malumbres M, Barbacid M (2007).** Cdk1 is sufficient to drive the mammalian cell cycle. *Nature* 448, 811-815.

**Sarikas A, Hartmann T, Pan ZQ (2011).** The cullin protein family. *Genome Biol* 12(4):220.

**Satyanarayana A, Kaldis P (2009).** Mammalian cell-cycle regulation: several Cdks, numerous cyclins and diverse compensatory mechanisms. *Oncogene* 28, 2925-2939.

**Sheu YJ, Stillman B (2006).** Cdc7-Dbf4 phosphorylates MCM proteins via a docking site-mediated mechanism to promote S phase progression. *Mol Cell* 24(1), 101-113.

**Shieh SY, Ahn J, Tamai K, Taya Y, Prives C (2000).** The human homologs of checkpoint kinases Chk1 and Cds1 (Chk2) phosphorylate p53 at multiple DNA damage-inducible sites. *Genes Dev* 14, 289-300.

**Shim EH, Johnson L, Noh HL, Kim YJ, Sun H, Zeiss C, Zhang H (2003).** Expression of the F-box protein SKP2 induces hyperplasia, dysplasia, and low-grade carcinoma in the mouse prostate. *Cancer Res* 63(7), 1583-1588.

**Shirayama M, Tóth A, Gálová M, Nasmyth K (1999).** APC (Cdc20) promotes exit from mitosis by destroying the anaphase inhibitor Pds1 and cyclin Clb5. *Nature* 402(6758), 203-207.

**Sigl R, Wandke C, Rauch V, Kirk J, Hunt T, Geley S (2009).** Loss of the mammalian APC/C activator FZR1 shortens G1 and lengthens S phase but has little effect on exit from mitosis. *J Cell Sci* 122(Pt 22), 4208-4217.

**Sivakumar S, Gorbsky GJ (2015).** Spatiotemporal regulation of the anaphase-promoting complex in mitosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 16(2), 82-94.

**Skaar JR, Pagano M (2008).** Cdh1: a master G0/G1 regulator. *Nat Cell Biol* 10(7), 755-757.

**Srinivasan SV, Dominguez-Sola D, Wang LC, Hyrien O, Gautier J (2013).** Cdc45 is a critical effector of myc-dependent DNA replication stress. *Cell Rep* 3(5), 1629-1639.

**Stegmüller J, Konishi Y, Huynh MA, Yuan Z, Dibacco S, Bonni A (2006).** Cell-intrinsic regulation of axonal morphogenesis by the Cdh1-APC target SnoN. *Neuron* 50(3), 389-400.



**Stemmann O, Zou H, Gerber SA, Gygi SP, Kirschner MW (2001).** Dual inhibition of sister chromatid separation at metaphase. *Cell* 107(6), 715-726.

**Sudakin V, Chan GK, Yen TJ (2001).** Checkpoint inhibition of the APC/C in HeLa cells is mediated by a complex of BUBR1, BUB3, CDC20, and MAD2. *J Cell Biol* 154(5), 925-936.

**Sudo T, Ota Y, Kotani S, Nakao M, Takami Y, Takeda S, Saya H (2001).** Activation of Cdh1-dependent APC is required for G1 cell cycle arrest and DNA damage-induced G2 checkpoint in vertebrate cells. *EMBO J* 20(22), 6499-6508.

**Sugimoto N, Kitabayashi I, Osano S, Tatsumi Y, Yugawa T, Narisawa-Saito M, Matsukage A, Kiyono T, Fujita M (2008).** Identification of novel human Cdt1-binding proteins by a proteomics approach: proteolytic regulation by APC/C-Cdh1. *Mol Biol Cell* 19(3), 1007-1021.

**Sugimoto N, Tatsumi Y, Tsurumi T, Matsukage A, Kiyono T, Nishitani H, Fujita M (2004).** Cdt1 phosphorylation by cyclin A-dependent kinases negatively regulates its function without affecting geminin binding. *J Biol Chem* 279(19), 19691-19697.

**Symeonidou IE, Taraviras S, Lygerou Z (2012).** Control over DNA replication in time and space. *FEBS Lett* 586(18), 2803-2812.

**Tanaka y Diffley (2002).** Deregulated G1-cyclin expression induces genomic instability by preventing efficient pre-RC formation. *Genes Dev* 16(20), 2639-2649.

**Tanaka S, Umemori T, Hirai K, Muramatsu S, Kamimura Y, Araki H (2007).** CDK-dependent phosphorylation of Sld2 and Sld3 initiates DNA replication in budding yeast. *Nature* 445, 328-332.

**Taylor WR, Stark GR (2001).** Regulation of the G2/M transition by p53. *Oncogene* 20, 1803-1815.

**Thomson AM, Gillespie PJ, Blow JJ (2010).** Replication factory activation can be decoupled from the replication timing program by modulating Cdk levels. *J Cell Biol* 188(2), 209-221.

**Thornton BR, Toczyski DP (2003).** Securin and B-cyclin/CDK are the only essential targets of the APC. *Nat Cell Biol* 5, 1090-1094.

**Toledo LI, Altmeyer M, Rask MB, Lukas C, Larsen DH, Povlsen LK, Bekker-Jensen S, Mailand N, Bartek K, Lukas J (2013).** ATR prohibits replication catastrophe by preventing global exhaustion

of RPA. *Cell* 155(5), 1088-1103.

**Torrents E (2014).** Ribonucleotide reductases: essential enzymes for bacterial life. *Front Cell Infect Microbiol* 4:52.

**Van Leuken R, Clijsters L, Wolthuis R (2008).** To cell cycle, swing the APC/C. *Biochim Biophys Acta* 1786(1), 49-59.

**Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN (2003).** The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif* 36(3), 131-149.

**Waizenegger IC, Giménez-Abián JF, Wernic D, Peters JM (2002).** Regulation of human separase by securin binding and autocleavage. *Curr Biol* 12(16), 1368-1378.

**Wang LM, Lu FF, Zhang SY, Yao RY, Xing XM, Wei ZM (2012).** Overexpression of catalytic subunit M2 in patients with ovarian cancer. *Chin Med J* 125(12), 2151-2156.

**Wäsch R, Robbins JA, Cross FR (2010).** The emerging role of APC/C<sup>Cdh1</sup> in controlling differentiation, genomic stability and tumor suppression. *Oncogene* 29(1), 1-10.

**Wei W, Ayad NG, Wan Y, Zhang GJ, Kirschner MW, Kaelin WG Jr (2004).** Degradation of the SCF component Skp2 in cell-cycle phase G1 by the anaphase-promoting complex. *Nature* 11, 194-198.

**Wilhelm T, Magdalou I, Barascu A, Técher H, Debatisse M, Lopez BS (2014).** Spontaneous slow replication fork progression elicits mitosis alterations in homologous recombination-deficient mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 111(2), 763-768.

**Willis N, Rhind N (2009).** Regulation of DNA replication by the S-phase DNA damage checkpoint. *Cell Div* 4:13.

**Wohlschlegel JA, Dwyer BT, Dhar SK, Cvetic C, Walter JC, Dutta A (2000).** Inhibition of eukaryotic DNA replication by geminin binding to Cdt1. *Science* 290(5500), 2309-2312.

**Woo RA, Poon RY (2003).** Cyclin-dependent kinases and S phase control in mammalian cells. *Cell Cycle* 2(4), 316-324.

**Wu G, Glickstein S, Liu W, Fujita T, Li W, Yang Q, Duvoisin R, Wan Y (2007).** The anaphase-promoting complex coordinates initiation of lens differentiation. *Mol Biol Cell* 18(3), 1018-1029.

**Xu B, Sun Z, Liu Z, Guo H, Liu Q, Jiang H, Zou Y, Gong Y, Tischfield JA, Shao C (2011).** Replication stress induces micronuclei comprising of aggregated DNA double-strand breaks. *PLoS One* 6(4), e18618.

**Xu X, Page JL, Surtees JA, Liu H, Lagedrost S, Lu Y, Bronson R, Alani E, Nikitin AY, Weiss RS (2008).** Broad overexpression of ribonucleotide reductase genes in mice specifically induces lung neoplasms. *Cancer Res* 68(8), 2652-2660.

**Yamada M, Watanabe K, Mistrik M, Vesela E, Protivankova I, Mailand N, Lee M, Masai H, Lukas J, Bartek J (2013).** ATR-Chk1-APC/C<sup>Cdh1</sup>-dependent stabilization of Cdc7-ASK (Dbf4) kinase is required for DNA lesion bypass under replication stress. *Genes Dev* 27(22), 2459-2472.

**Yang XH, Zou L (2006).** Recruitment of ATR-ATRIP, Rad17, and 9-1-1 complexes to DNA damage. *Methods Enzymol* 409, 118-131.

**Yekezare M, Gómez-González B, Diffley JF (2013).** Controlling DNA replication origins in response to DNA damage - inhibit globally, activate locally. *J Cell Sci* 126(Pt 6), 1297-1306.

**Ylikallio E, Page JL, Xu X, Lampinen M, Bepler G, Ide T, Tynismaa H, Weiss RS, Suomalainen A (2010).** Ribonucleotide reductase is not limiting for mitochondrial DNA copy number in mice. *Nucleic Acids Research* 38(22), 8208-8218.

**Yokochi T, Gilbert DM (2007).** Replication labeling with halogenated thymidine analogs. *Curr Protoc Cell Biol* Chapt 22. Unit 22.10

**Yousefi B, Rahmati M, Ahmadi Y (2014).** The roles of p53R2 in cancer progression based on the new function of mutant p53 and cytoplasmic p21. *Life Sci* 99, 14-17.

**Yuan X, Srividhya J, De Luca T, Lee JH, Pomerening JR (2014).** Uncovering the role of APC-Cdh1 in generating the dynamics of S-phase onset. *Mol Biol Cell* 25(4), 441-456.

**Zeman MK, Cimprich KA (2014).** Causes and consequences of replication stress. *Nat Cell Biol* 16, 2-9.

**Zhang L, Wang C (2006).** F-box protein Skp2: a novel transcriptional target of E2F. *Oncogene* 25(18), 2615-2627.

**Zhang YW, Jones TL, Martin SE, Caplen NJ, Pommier Y (2009).** Implication of checkpoint kinase-dependent up-regulation of ribonucleotide reductase R2 in DNA damage response. *J Biol Chem*

284(27), 18085-18095.

**Zhong Y, Nellimoottil T, Peace JM, Knott SR, Villwock SK, Yee JM, Jancuska JM, Rege S, Tecklenburg M, Sclafani RA, Tavaré S, Aparicio OM (2013).** The level of origin firing inversely affects the rate of replication fork progression. *J Cell Biol* 201(3), 373-383.

**Zhou Y, Ching YP, Chun AC, Jin Dy (2003).** Nuclear localization of the cell cycle regulator CDH1 and its regulation by phosphorylation. *J Biol Chem* 278(4), 12530-12536.

**Zhu CQ, Blackhall FH, Pintilie M, Iyengar P, Liu N, Ho J, Chomiak T, Lau D, Winton T, Shepherd FA, Tsao MS (2004).** Skp2 gene copy number aberrations are common in non-small cell lung carcinoma, and its overexpression in tumors with ras mutation is a poor prognostic marker. *Clin Cancer Res* 10(6), 1984-1991.

**Zhu L (2010).** Skp2 knockout reduces cell proliferation and mouse body size: and prevents cancer? *Cell Res* 20(6), 605-607.

**Zielke N, Querings S, Rottig C, Lehner C, Sprenger F (2008).** The anaphase-promoting complex/cyclosome (APC/C) is required for rereplication control in endoreplication cycles. *Genes Dev* 22(12), 1690-1703.

**Zou L, Elledge SJ (2003).** Sensing DNA damage through ATRIP recognition or RPA-ssDNA complexes. *Science* 300, 1542-1548.

**Zou L, Liu D, Elledge SJ (2003).** Replication protein A-mediated recruitment and activation of Rad17 complexes. *Proc Natl Acad Sci USA* 100(24), 13827-13832.

A decorative background consisting of a grid of thick black lines. There are two vertical lines and two horizontal lines, creating a 3x3 grid of squares. The lines are of uniform thickness and intersect at right angles.

# *Agradecimientos*



Y llegó el momento de agradecer. De agradecer a todos aquellos que han influido de alguna u otra manera en mi forma de ser y pensar, tanto desde el punto de vista personal como científico.

Permitidme que comience con mi familia. Gracias a mis padres, por regalarme la vida y por ofrecerme unos valores y educación de los cuales me siento orgulloso. Gracias a mi hermano, por ser el espejo en el que siempre me fijaba cuando era pequeño y por compartir juegos, viajes y, por qué no decirlo, alguna que otra pelea. A los tres, aunque no lo manifieste muy a menudo, sabed que sois una parte primordial e insustituible para mí.

A mis amigos, especialmente a los que confiasteis en mí y me animasteis a dedicarme a esto de la investigación. A la pandilla del cole, principalmente a Alberto, porque a pesar de emigrar fuera de Salamanca en busca de mejores oportunidades, siempre hay algún finde para recordar viejos tiempos. Y a mis compañeros farmacéuticos (Álvaro, Antonio, Silvia, Sandra, Javi...), porque aunque nuestros caminos también se han ido separando, compartir aquellos años de carrera con vosotros siempre quedará en mi recuerdo.

Adentrémonos ahora en el IBFG. Concretamente en el laboratorio 2.6. En primer lugar, Sergio, gracias por darme la oportunidad de iniciarme en este mundillo. Por tu talante positivo y conciliador, y por darme todas las facilidades posibles para realizar el proyecto. Porque tener un jefe que no pone trabas, sino que allana la labor y aporta su conocimiento y experiencia, es una fortuna. E Irene. Gracias por tu tutela. Lo que soy como investigador, aunque no sea mucho, te lo debo a ti. Llegué al laboratorio como un analfabeto, y al menos me marcharé conociendo ya el abecedario. Tu amor y dedicación por la ciencia se plasma en tu trabajo diario y es un ejemplo del cual aprender. Espero haberme empapado de algo durante estos años de tesis.

Vamos con el resto del labo. Para que no penséis que hay preferencias, lo haré por orden alfabético. Anaé, umm..., ¿adónde se irá Anaé este año de vacaciones? Bueno, a lo importante, ¡tu labor es fundamental para el grupo! (se nota sobre todo cuando no estás). Nos haces la tarea más fácil al resto y eres el reflejo de que el orden y la organización son básicos para trabajar mejor. Y si alguno se relaja, ¡zasca!, correo de Anaé para ponernos firmes. Echaré de menos tu naturalidad y cercanía. Bueno, y también un poco las conversaciones sobre comida y nuevas y apetitosas recetas. Ángela, cuánta falta hacía en el labo un poco de frescor sureño.

Tu alegría y espontaneidad son un regalo para el grupo. Hay gente que tiene gracia e ingenio para contar las cosas, y tú eres de ellas. Aunque aspire las jotas y te comas las eses. Mucha suerte con la tesis, seguro que al final sale algo interesante. Livia, la paciencia personificada. Una de las cosas negativas de haber trabajado con ratones es haberme perdido tu sabiduría “levaduriana”. Tu categoría humana es inversamente proporcional al volumen de tu voz. Que no te venza la timidez, tienes mucho de lo que sentirse orgullosa. Y te lo dice alguien en constante lucha con su parte introvertida. Marta, si te lo propones puedes llegar muy lejos. En mi opinión, tienes los dos ingredientes necesarios para triunfar en ciencia. Eres inteligente, muy inteligente, y trabajadora hasta la extenuación. Y hablando de ingredientes, ojalá mantengas esa afición por la repostería y sigas endulzando a tus futuros compañeros con tus tartas y pastas caseras. Rubén, estás como una cabra. Te ha tocado pasar malos ratos. La vida a veces tiene esas cosas, que se ceba con las buenas personas. Tu disponibilidad por ayudar es siempre la mejor y tu entusiasmo por el trabajo, contagioso. Pero sin duda me quedo con tu lado personal, generosidad y honestidad en cantidades industriales. Te mereces lo mejor. Puxa Asturias! Silvia, te tocó la última. Gracias por tus continuos ánimos y por el apoyo para terminar la tesis. Esos meses de “destierro” antes de llegar al IBFG fraguaron una conexión más estrecha. Gracias por escucharme cuando he necesitado desahogar alguna preocupación o queja. Te has ganado mi confianza. Y gracias por ayudarme con las depilaciones (uy, a lo mejor esto debería explicarlo mejor).

También me gustaría acordarme de todos aquellos que ya no están en el grupo, pero con los que coincidí durante algún tiempo. Ellos también aportaron su granito de arena para que la tesis que ahora llega a su fin sea una realidad. Tanto por sus aportaciones científicas, como por su contribución a un espacio de trabajo donde reinara la cordialidad y el compañerismo. Un recuerdo especial para Nathalia, mi predecesora en esto de doctorarse. Qué fortaleza la tuya para sacar adelante el proyecto a la vez que criabas a un niño. Pero también me vienen a la cabeza Javi Botet, Myriam, Noelia, Ana Belén. A todos ellos, gracias.

Antes de terminar, me gustaría detenerme un momento en el laboratorio 2.9. Porque hay allí dos chicas muy majas que se merecen un comentario de mi parte. Cami, terremoto de vitalidad y energía. Me has sacado unas cuantas sonrisas, y eso siempre es saludable. Gracias por compartir sendas, por tus bromas y por perderme el respeto. Y Sara, corazón de oro. Una pizca de franqueza y sinceridad nunca vienen mal en estos tiempos. Que la buena música te acompañe toda la vida.



*No me voy a extender más. Seguramente me olvide de alguien. Si es así y crees que deberías figurar en este apartado, no me lo tengas muy en cuenta y date por agradecido igualmente.*

*A todos vosotros, gracias.*

*Javier*